

B4

990739.BT

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. Mai 2003 (22.05.2003)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
PCT WO 03/042389 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/53, (74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; 67056 Ludwigshafen (DE).
9/04, 1/21, C12P 13/08

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/12556 (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
11. November 2002 (11.11.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 55 505.9 13. November 2001 (13.11.2001) DE

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ZELDER, Oskar [DE/DE]; Franz-Stützel-Strasse 8, 67346 Speyer (DE). POMPEJUS, Markus [DE/DE]; Wenjenstrasse 21, 67251 Freinsheim (DE). SCHRÖDER, Hartwig [DE/DE]; Benzstrasse 4, 69226 Nussloch (DE). KRÖGER, Burkhard [DE/DE]; Im Waldhof 1, 67117 Limburgerhof (DE). KLOPPROGGE, Corinna [DE/DE]; Diemersteinstrasse 3, 67065 Ludwigshafen (DE). HABERHAUER, Gregor [DE/DE]; Moselstrasse 42, 67117 Limburgerhof (DE).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 03/042389 A1

(54) Title: GENES CODING FOR GLUCOSE-6-PHOSPHATE-DEHYDROGENASE PROTEINS

(54) Bezeichnung: GENE DIE FÜR GLUCOSE-6-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE PROTEINE CODIEREN

(57) Abstract: The invention relates to an isolated nucleic acid molecule coding for a polypeptide comprising the amino acid sequence which is respectively referred to in table 1/column 2. Said nucleic acid molecule which is in the amino acid position indicated in table 1/column 4 codes for a different proteinogenous amino acid to the one which is indicated on the same line in table 1/column 5.

(57) Zusammenfassung: Isoliertes Nukleinsäuremolekül codierend für ein Polypeptid mit der jeweils in Tabelle 1/Spalte 2 in Bezug genommenen Aminosäuresequenz wobei das Nukleinsäuremolekül in der in Tabelle 1/Spalte 4 angegebenen Aminosäureposition eine andere proteinogene Aminosäure codiert als die jeweilige in Tabelle 1/Spalte 5 in der gleichen Zeile angegebene Aminosäure.

Gene die für Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase Proteine codieren

Hintergrund der Erfindung

5

Bestimmte Produkte und Nebenprodukte von natürlich-vorkommenden Stoffwechselprozessen in Zellen werden in vielen Industriezweigen verwendet, einschließlich der Nahrungsmittel-, Futtermittel-, Kosmetik- und pharmazeutischen Industrie. Diese Moleküle, die
10 gemeinsam als "Feinchemikalien" bezeichnet werden, umfassen organische Säuren, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Nukleotide und Nukleoside, Lipide und Fettsäuren, Diole, Kohlehydrate, aromatische Verbindungen, Vitamine und Co-faktoren sowie Enzyme. Ihre Produktion erfolgt am besten mittels
15 Anzucht von Bakterien im Großmaßstab, die entwickelt wurden, um große Mengen des jeweils gewünschten Moleküls zu produzieren und sezernieren. Ein für diesen Zweck besonders geeigneter Organismus ist *Corynebacterium glutamicum*, ein gram-positives, nicht-pathogenes Bakterium. Über Stamms Selektion ist eine Reihe von Mutanten-
20 stämmen entwickelt worden, die ein Sortiment wünschenswerter Verbindungen produzieren. Die Auswahl von Stämmen, die hinsichtlich der Produktion eines bestimmten Moleküls verbessert sind, ist jedoch ein zeitaufwendiges und schwieriges Verfahren.

25 Zusammenfassung der Erfindung

Diese Erfindung stellt neuartige Nukleinsäuremoleküle bereit, die sich zur Identifizierung oder Klassifizierung von *Corynebacterium glutamicum* oder verwandten Bakterienarten verwenden lassen.
30 *C. glutamicum* ist ein gram-positives, aerobes Bakterium, das in der Industrie für die Produktion im Großmaßstab einer Reihe von Feinchemikalien, und auch zum Abbau von Kohlenwasserstoffen (bspw. beim Überlaufen von Rohöl) und zur Oxidation von Terpenoiden gemeinhin verwendet wird. Die Nukleinsäuremoleküle können da-
35 her zum Identifizieren von Mikroorganismen eingesetzt werden, die sich zur Produktion von Feinchemikalien, bspw. durch Fermentationsverfahren, verwenden lassen. *C. glutamicum* selbst ist zwar nicht-pathogen, jedoch ist es mit anderen *Corynebacterium*-Arten, wie *Corynebacterium diphtheriae* (dem Erreger der Diphtherie) ver-
40 wandt, die bedeutende Pathogene beim Menschen sind. Die Fähigkeit, das Vorhandensein von *Corynebacterium*-Arten zu identifizieren, kann daher auch eine signifikante klinische Bedeutung haben, z.B. bei diagnostischen Anwendungen. Diese Nukleinsäuremoleküle können zudem als Bezugspunkte zur Kartierung des *C. glutamicum*-
45 Genoms der von Genomen verwandter Organismen dienen.

Diese neuen Nukleinsäuremoleküle codieren Proteine, die als Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase bezeichnet werden.

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase Gene aus Corynebakterien sind
5 beispielsweise in EP 1108790A2 beschrieben. Allerdings codieren
die dort beschriebenen Gene für Polypeptidsequenzen, die kürzer
als die hier erfindungsgemäß beschriebenen sind. Die in
EP 1108790A2 beschriebene Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase ist am
N-Terminus um 30 Aminosäuren verkürzt gegenüber der hier bean-
10 spruchten Polypeptidsequenz.

Von Moritz et al. (Eur. J. Biochemistry 267, 3442-3452, 2000)
wird die Isolierung einer Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus
Corynebacterium glutamicum beschrieben. Die dort beschriebene
15 N-Terminale Proteinsequenzierung ergibt ein Polypeptid, das mit
einem Serin startet und verschieden von dem erfindungsgemäßen
Protein ist.

Gegenstand der Erfindung sind neue Gene für Glucose-6-Phosphat-
20 Dehydrogenase, die mit der Aminosäure in Position 1 oder 2, d.h.
Val oder Ser, starten und an der Position 243 eine proteinogene
Aminosäure codieren, die nicht Ala ist (Nummerierung bezogen auf
SEQ ID NO:2).

25 Besonders bevorzugt sind neue Gene für Glucose-6-Phosphat-
Dehydrogenase, die mit der Aminosäure in Position 1 starten und
an der Position 243 Thr codieren (Nummerierung bezogen auf SEQ
ID NO:2).

30 Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle lassen sich zur gene-
tischen Manipulation eines Organismus verwenden, um ihn als Pro-
duzenten von einer oder mehreren Feinchemikalien besser und effi-
zienter zu machen. Die erfindungsgemäßen Moleküle lassen sich so
modifizieren, daß die Ausbeute, Produktion und/oder die Effizienz
35 der Produktion von einer oder mehreren Feinchemikalien verbessert
wird.

Die erfindungsgemäßen Moleküle können ferner an einem oder mehre-
ren intrazellulären Signaltransduktionswegen beteiligt sein, die
40 die Ausbeuten und/oder die Geschwindigkeit der Produktion einer
oder mehrerer Feinchemikalien von *C. glutamicum* beeinflussen.
Proteine, die bspw. für den Import von einem oder mehreren Zuk-
kern aus dem extrazellulären Medium nötig sind (bspw. Hpr,
Enzym I, oder ein Bestandteil des Enzym-II-Komplexes), werden bei
45 Vorhandensein einer hinreichenden Menge Zucker in der Zelle häu-
fig posttranslational modifiziert, so daß sie diesen Zucker nicht
mehr importieren können. Die Zuckermenge, bei der das Transport-

system abgeschaltet wird, reicht zwar zur Aufrechterhaltung der normalen Zellfunktionen aus, jedoch schränkt sie die Überproduktion der gewünschten Feinchemikalie ein. Es empfiehlt sich daher, die erfindungsgemäßen Proteine zu modifizieren, so daß sie auf
5 eine solche negative Regulation nicht mehr ansprechen. Dadurch lassen sich höhere intrazelluläre Konzentrationen eines oder mehrerer Zucker und durch Extension eine effizientere Produktion oder höhere Ausbeuten von einer oder mehreren Feinchemikalien aus Organismen erzielen, die diese mutanten Proteine enthalten.

10

Als Anhang A werden im folgenden die Nukleinsäuresequenzen des Sequenzprotokolls zusammen mit den in Tabelle 1 beschriebenen Sequenzveränderungen an der jeweiligen Position definiert.

15 Als Anhang B werden im folgenden die Polypeptidsequenzen des Sequenzprotokolls zusammen mit den in Tabelle 1 beschriebenen Sequenzveränderungen an der jeweiligen Position definiert.

Bei einer weiteren Ausführungsform ist das isolierte Nukleinsäuremolekül mindestens 15 Nukleotide lang und hybridisiert unter
20 stringenten Bedingungen an ein Nukleinsäuremolekül, das eine Nukleotidsequenz aus Anhang A umfaßt. Das isolierte Nukleinsäuremolekül entspricht vorzugsweise einem natürlich vorkommenden Nukleinsäuremolekül. Die isolierte Nukleinsäure codiert stärker
25 bevorzugt ein natürlich vorkommendes *C. glutamicum*-G6PD-Protein oder einen biologisch aktiven Abschnitt davon.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Vektoren, bspw. rekombinante Expressionsvektoren, die die erfindungsgemäßen
30 Nukleinsäuremoleküle enthalten, und Wirtszellen, in die diese Vektoren eingebracht worden sind. Bei einer Ausführungsform wird zur Herstellung eines G6PD-Proteins eine Wirtszelle verwendet, die in einem geeigneten Medium gezüchtet wird. Das G6PD-Protein kann dann aus dem Medium oder der Wirtszelle isoliert werden.

35

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft einen genetisch veränderten Mikroorganismus, bei dem ein G6PD-Gen eingebracht oder verändert worden ist. Das Genom des Mikroorganismus ist bei einer Ausführungsform durch Einbringen mindestens eines erfindungs-
40 gemäßen Nukleinsäuremoleküls verändert worden, das die mutierte G6PD-Sequenz als Transgen codiert. Bei einer anderen Ausführungsform ist ein endogenes G6PD-Gen im Genom des Mikroorganismus durch homologe Rekombination mit einem veränderten G6PD-Gen verändert, z.B. funktionell disruptiert, worden. Der Mikroorganismus
45 gehört bei einer bevorzugten Ausführungsform zur Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium*, wobei *Corynebacterium glutamicum* besonders bevorzugt ist. Der Mikroorganismus wird in einer bevor-

zugten Ausführungsform auch zur Herstellung einer gewünschten Verbindung, wie einer Aminosäure, besonders bevorzugt Lysin, verwendet.

- 5 Eine weitere bevorzugte Ausführungsform sind Wirtszellen, die mehr als eine der in Anhang A beschriebenen Nukleinsäuremoleküle besitzen. Solche Wirtszellen lassen sich auf verschiedene dem Fachmann bekannte Wege herstellen. Beispielsweise können sie durch Vektoren, die mehrere der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremo-
- 10 leküle tragen, transfiziert werden. Es ist aber auch möglich mit einem Vektor jeweils ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül in die Wirtszelle einzubringen und deshalb mehrere Vektoren entweder gleichzeitig oder zeitlich abgestuft einzusetzen. Es können somit Wirtszellen konstruiert werden, die zahlreiche, bis zu mehreren
- 15 Hundert der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen tragen. Durch eine solche Akkumulation lassen sich häufig überadditive Effekte auf die Wirtszelle hinsichtlich der Feinchemikalien-Produktivität erzielen.
- 20 Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein isoliertes G6PD-Protein oder einen Abschnitt, bspw. einen biologisch aktiven Abschnitt davon. Das isolierte G6PD-Protein oder sein Abschnitt kann in einer bevorzugten Ausführungsform am Import von energiereichen Kohlenstoff-Molekülen (bspw. Glucose, Fructose oder Sac-
- 25 charose) in *C. glutamicum* und zudem an einem oder mehreren intrazellulären Signaltransduktionswegen von *C. glutamicum* beteiligt sein. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das isolierte G6PD-Protein oder ein Abschnitt davon hinreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz von Anhang B, so daß das Protein oder
- 30 sein Abschnitt weiterhin am Import von energiereichen Kohlenstoff-Molekülen (bspw. Glucose, Fructose oder Saccharose) in *C. glutamicum* und/oder an einem oder mehreren intrazellulären Signaltransduktionswegen von *C. glutamicum* teilnehmen kann.
- 35 Die Erfindung betrifft zudem ein isoliertes Glu-6-Phosphat-DehydrogenaseProteinpräparat. Das Glu-6-Phosphat-DehydrogenaseG6PD-Protein umfaßt bei bevorzugten Ausführungsformen eine Aminosäuresequenz aus Anhang B. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein isoliertes Vollängenprotein, das
- 40 zu einer vollständigen Aminosäuresequenz aus Anhang B (welche von einem offenen Leseraster in Anhang A codiert wird) im wesentlichen homolog ist.

- Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer Feinchemikalie. Das Verfahren sieht die Anzucht
- 45 einer Zelle vor, die einen Vektor enthält, der die Expression eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls bewirkt, so daß eine

Feinchemikalie produziert wird. Dieses Verfahren umfaßt bei einer bevorzugten Ausführungsform zudem den Schritt der Gewinnung einer Zelle, die einen solchen Vektor enthält, wobei die Zelle mit einem Vektor transfiziert ist, der die Expression einer Nukleinsäure bewirkt. Dieses Verfahren umfaßt bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform zudem den Schritt, bei dem die Feinchemikalie aus der Kultur gewonnen wird. Die Zelle gehört bei einer bevorzugten Ausführungsform zur Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium*.

10

I. Feinchemikalien

Der Begriff "Feinchemikalie" ist im Fachgebiet bekannt und beinhaltet Moleküle, die von einem Organismus produziert werden und in verschiedenen Industriezweigen Anwendungen finden, wie bspw., jedoch nicht beschränkt auf die pharmazeutische Industrie, die Landwirtschafts-, und Kosmetik-Industrie. Diese Verbindungen umfassen organische Säuren, wie Weinsäure, Itaconsäure und Diaminopimelinsäure, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen, Nukleoside und Nukleotide (wie bspw. beschrieben in Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, S. 561-612, in Biotechnology Bd. 6, Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten), Lipide, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (bspw. Arachidonsäure), Diole (bspw. Propandiol und Butandiol), Kohlenhydrate (bspw. Hyaluronsäure und Trehalose), aromatische Verbindungen (bspw. aromatische Amine, Vanillin und Indigo), Vitamine und Cofaktoren (wie beschrieben in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A27, "Vitamins", S. 443-613 (1996) VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten; und Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press (1995)), Enzyme und sämtliche anderen von Gutcho (1983) in Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 und den darin angegebenen Literaturstellen, beschriebenen Chemikalien. Der Metabolismus und die Verwendungen bestimmter Feinchemikalien sind nachstehend weiter erläutert.

40

A. Aminosäure-Metabolismus und Verwendungen

Die Aminosäuren umfassen die grundlegenden Struktureinheiten sämtlicher Proteine und sind somit für die normalen Zellfunktionen essentiell. Der Begriff "Aminosäure" ist im Fachgebiet bekannt. Die proteinogenen Aminosäuren, von denen es 20 Arten gibt,

45

6

dienen als Struktureinheiten für Proteine, in denen sie über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind, wohingegen die nicht-proteinogenen Aminosäuren (von denen Hunderte bekannt sind) gewöhnlich nicht in Proteinen vorkommen (siehe Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57-97 VCH: Weinheim (1985)). Die Aminosäuren können in der D- oder L-Konfiguration vorliegen, obwohl L-Aminosäuren gewöhnlich der einzige Typ sind, den man in natürlich vorkommenden Proteinen vorfindet. Biosynthese- und Abbauwege von jeder der 20 proteinogenen Aminosäuren sind sowohl bei prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellen gut charakterisiert (siehe bspw. Stryer, L. Biochemistry, 3. Auflage, S. 578-590 (1988)). Die "essentiellen" Aminosäuren (Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan und Valin), so bezeichnet, da sie aufgrund der Komplexität ihrer Biosynthese mit der Ernährung aufgenommen werden müssen, werden durch einfache Biosynthesewege in die übrigen 11 "nichtessentiellen" Aminosäuren (Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, Cystein, Glutamat, Glutamin, Glycin, Prolin, Serin und Tyrosin) umgewandelt. Höhere Tiere besitzen die Fähigkeit, einige dieser Aminosäuren zu synthetisieren, jedoch müssen die essentiellen Aminosäuren mit der Nahrung aufgenommen werden, damit eine normale Proteinsynthese stattfindet.

Abgesehen von ihrer Funktion bei der Proteinbiosynthese sind diese Aminosäuren interessante Chemikalien an sich, und man hat entdeckt, daß viele bei verschiedenen Anwendungen in der Nahrungsmittel-, Futter-, Chemie-, Kosmetik-, Landwirtschafts- und pharmazeutischen Industrie zum Einsatz kommen. Lysin ist nicht nur für die Ernährung des Menschen eine wichtige Aminosäure, sondern auch für monogastrische Tiere, wie Geflügel und Schweine. Glutamat wird am häufigsten als Geschmacksadditiv (Mononatriumglutamat, MSG) sowie weithin in der Nahrungsmittelindustrie verwendet, wie auch Aspartat, Phenylalanin, Glycin und Cystein. Glycin, L-Methionin und Tryptophan werden sämtlich in der pharmazeutischen Industrie verwendet. Glutamin, Valin, Leucin, Isoleucin, Histidin, Arginin, Prolin, Serin und Alanin werden in der pharmazeutischen Industrie und der Kosmetikindustrie verwendet. Threonin, Tryptophan und D-/L-Methionin sind weitverbreitete Futtermittelzusätze (Leuchtenberger, W. (1996) Amino acids - technical production and use, S. 466-502 in Rehm et al., (Hrsg.) Biotechnology Bd. 6, Kapitel 14a, VCH: Weinheim). Man hat entdeckt, daß sich diese Aminosäuren außerdem als Vorstufen für die Synthese von synthetischen Aminosäuren und Proteinen, wie N-Acetylcystein, S-Carboxymethyl-L-cystein, (S)-5-Hydroxytryptophan und anderen, in Ullmann's Encyclopedia

of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57-97, VCH, Weinheim, 1985 beschriebenen Substanzen eignen.

Die Biosynthese dieser natürlichen Aminosäuren in Organismen, die sie produzieren können, bspw. Bakterien, ist gut charakterisiert worden (für einen Überblick der bakteriellen Aminosäure-Biosynthese und ihrer Regulation, s. Umbarger, H.E. (1978) Ann. Rev. Biochem. 47: 533 - 606). Glutamat wird durch reduktive Aminierung von α -Ketoglutarat, einem Zwischenprodukt im Citronensäure-Zyklus, synthetisiert. Glutamin, Prolin und Arginin werden jeweils nacheinander aus Glutamat erzeugt. Die Biosynthese von Serin erfolgt in einem Dreischritt-Verfahren und beginnt mit 3-Phosphoglycerat (einem Zwischenprodukt bei der Glykolyse), und ergibt nach Oxidations-, Transaminierungs- und Hydrolyseschritten diese Aminosäure. Cystein und Glycin werden jeweils aus Serin produziert, und zwar die erstere durch Kondensation von Homocystein mit Serin, und die letztere durch Übertragung des Seitenketten- β -Kohlenstoffatoms auf Tetrahydrofolat, in einer durch Serintranshydroxymethylase katalysierten Reaktion. Phenylalanin und Tyrosin werden aus den Vorstufen des Glycolyse- und Pentosephosphatweges, Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat in einem 9-Schritt-Biosyntheseweg synthetisiert, der sich nur in den letzten beiden Schritten nach der Synthese von Prephenat unterscheidet. Tryptophan wird ebenfalls aus diesen beiden Ausgangsmolekülen produziert, jedoch erfolgt dessen Synthese in einem 11-Schritt-Weg. Tyrosin läßt sich in einer durch Phenylalaninhydroxylase katalysierten Reaktion auch aus Phenylalanin herstellen. Alanin, Valin und Leucin sind jeweils Biosyntheseprodukte aus Pyruvat, dem Endprodukt der Glykolyse. Aspartat wird aus Oxalacetat, einem Zwischenprodukt des Citratzyklus, gebildet. Asparagin, Methionin, Threonin und Lysin werden jeweils durch Umwandlung von Aspartat produziert. Isoleucin wird aus Threonin gebildet. In einem komplexen 9-Schritt-Weg erfolgt die Bildung von Histidin aus 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat, einem aktivierten Zucker.

Aminosäuren, deren Menge den Proteinbiosynthesebedarf der Zelle übersteigt, können nicht gespeichert werden, und werden stattdessen abgebaut, so daß Zwischenprodukte für die Haupt-Stoffwechselwege der Zelle bereitgestellt werden (für einen Überblick siehe Stryer, L., Biochemistry, 3. Aufl. Kap. 21 "Amino Acid Degradation and the Urea Cycle"; S 495-516 (1988)). Die Zelle ist zwar in der Lage, ungewünschte Aminosäuren in nützliche Stoffwechsel-Zwischenprodukte umzuwandeln, jedoch ist die Aminosäureproduktion hinsichtlich der Energie, der Vorstufenmoleküle und der für ihre Synthese nötigen Enzyme aufwendig. Es überrascht daher nicht, daß die Aminosäure-Biosynthese durch Feedback-Hemmung reguliert wird,

wobei das Vorliegen einer bestimmten Aminosäure ihre eigene Produktion verlangsamt oder ganz beendet (für einen Überblick über den Rückkopplungs-Mechanismus bei Aminosäure-Biosynthesewegen, siehe Stryer, L., Biochemistry, 3. Aufl., Kap. 24, "Biosynthesis of Amino Acids and Heme", S. 575-600 (1988)). Der Ausstoß einer bestimmten Aminosäure wird daher durch die Menge dieser Aminosäure in der Zelle eingeschränkt.

10 B. Vitamine, Cofaktoren und Nutrazeutika-Metabolismus sowie Verwendungen

Vitamine, Cofaktoren und Nutrazeutika umfassen eine weitere Gruppe von Molekülen. Höhere Tiere haben die Fähigkeit verloren, diese zu synthetisieren und müssen sie somit aufnehmen, obwohl sie leicht durch andere Organismen, wie Bakterien, synthetisiert werden. Diese Moleküle sind entweder biologisch aktive Moleküle an sich oder Vorstufen von biologisch aktiven Substanzen, die als Elektronenträger oder Zwischenprodukte bei einer Reihe von Stoffwechselwegen dienen. Diese Verbindungen haben neben ihrem Nährwert auch einen signifikanten industriellen Wert als Farbstoffe, Antioxidantien und Katalysatoren oder andere Verarbeitungs-Hilfsstoffe. (Für einen Überblick über die Struktur, Aktivität und die industriellen Anwendungen dieser Verbindungen siehe bspw. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996). Der Begriff "Vitamin" ist im Fachgebiet bekannt und umfaßt Nährstoffe, die von einem Organismus für eine normale Funktion benötigt werden, jedoch nicht von diesem Organismus selbst synthetisiert werden können. Die Gruppe der Vitamine kann Cofaktoren und nutrazeutische Verbindungen umfassen. Der Begriff "Cofaktor" umfaßt nicht-proteinartige Verbindungen, die für das Auftreten einer normalen Enzymaktivität nötig sind. Diese Verbindungen können organisch oder anorganisch sein; die erfindungsgemäßen Cofaktor-Moleküle sind vorzugsweise organisch. Der Begriff "Nutrazeutikum" umfaßt Nahrungsmittelzusätze, die bei Pflanzen und Tieren, insbesondere dem Menschen, gesundheitsfördernd sind. Beispiele solcher Moleküle sind Vitamine, Antioxidantien und ebenfalls bestimmte Lipide (z.B. mehrfach ungesättigte Fettsäuren).

Die Biosynthese dieser Moleküle in Organismen, die zu ihrer Produktion befähigt sind, wie Bakterien, ist umfassend charakterisiert worden (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996, Michal, G. (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley & Sons; Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associa-

tions in Malaysia and the Society for free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCs Press, Champaign, IL X, 374 S).

- 5 Thiamin (Vitamin B₁) wird durch chemisches Kuppeln von Pyrimidin und Thiazol-Einheiten gebildet. Riboflavin (Vitamin B₂) wird aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) und Ribose-5'-phosphat synthetisiert. Riboflavin wiederum wird zur Synthese von Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadeninukleotid (FAD) eingesetzt. Die
- 10 Familie von Verbindungen, die gemeinsam als "Vitamin B₆" bezeichnet werden (bspw. Pyridoxin, Pyridoxamin, Pyridoxal-5'-phosphat und das kommerziell verwendete Pyridoxinhydrochlorid), sind alle Derivate der gemeinsamen Struktureinheit 5-Hydroxy-6-methylpyridin. Panthothenat (Pantothenensäure, R-(+)-N-(2,4-Dihydroxy-
- 15 3,3-dimethyl-1-oxobutyl)- β -alanin) kann entweder durch chemische Synthese oder durch Fermentation hergestellt werden. Die letzten Schritte bei der Panthothenat-Biosynthese bestehen aus der ATP-getriebenen Kondensation von β -Alanin und Pantoinsäure. Die für die Biosyntheseschritte für die Umwandlung in Pantoinsäure, in
- 20 β -Alanin und zur Kondensation in Pantothenensäure verantwortlichen Enzyme sind bekannt. Die metabolisch aktive Form von Panthothenat ist Coenzym A, dessen Biosynthese über 5 enzymatische Schritte verläuft. Panthothenat, Pyridoxal-5'-phosphat, Cystein und ATP sind die Vorstufen von Coenzym A. Diese Enzyme katalysieren nicht
- 25 nur die Bildung von Panthothenat, sondern auch die Produktion von (R)-Pantoinsäure, (R)-Pantolacton, (R)-Panthenol (Provitamin B₅), Pantethein (und seinen Derivaten) und Coenzym A.

- Die Biosynthese von Biotin aus dem Vorstufenmolekül Pimeloyl-CoA
- 30 in Mikroorganismen ist ausführlich untersucht worden, und man hat mehrere der beteiligten Gene identifiziert. Es hat sich herausgestellt, daß viele der entsprechenden Proteine an der Fe-Cluster-Synthese beteiligt sind und zu der Klasse der nifS-Proteine gehören. Die Liponsäure wird von der Octanonsäure abgeleitet und
- 35 dient als Coenzym beim Energie-Metabolismus, wo sie Bestandteil des Pyruvatdehydrogenasekomplexes und des α -Ketoglutaratdehydrogenasekomplexes wird. Die Folate sind eine Gruppe von Substanzen, die alle von der Folsäure abgeleitet werden, die wiederum von L-Glutaminsäure, p-Aminobenzoessäure und 6-Methylpterin hergeleitet
- 40 ist. Die Biosynthese der Folsäure und ihrer Derivate, ausgehend von den metabolischen Stoffwechselzwischenprodukten Guanosin-5'-triphosphat (GTP), L-Glutaminsäure und p-Aminobenzoessäure ist in bestimmten Mikroorganismen eingehend untersucht worden.
- 45 Corrinioide (wie die Cobalamine und insbesondere Vitamin B₁₂) und die Porphyrine gehören zu einer Gruppe von Chemikalien, die sich durch ein Tetrapyrrol-Ringsystem auszeichnen. Die Biosynthese von

10

Vitamin B₁₂ ist hinreichend komplex, daß sie noch nicht vollständig charakterisiert worden ist, jedoch ist inzwischen ein Großteil der beteiligten Enzyme und Substrate bekannt. Nikotinsäure (Nikotinat) und Nikotinamid sind Pyridin-Derivate, die auch als
5 "Niacin" bezeichnet werden. Niacin ist die Vorstufe der wichtigen Coenzyme NAD (Nikotinamidadenindinukleotid) und NADP (Nikotinamidadenindinukleotidphosphat) und ihrer reduzierten Formen.

Die Produktion dieser Verbindungen im Großmaßstab beruht größtenteils auf zellfreien chemischen Synthesen, obwohl einige dieser
10 Chemikalien ebenfalls durch großangelegte Anzucht von Mikroorganismen produziert worden sind, wie Riboflavin, Vitamin B₆, Pantothenat und Biotin. Nur Vitamin B₁₂ wird aufgrund der Komplexität seiner Synthese lediglich durch Fermentation produziert. In-vitro-Verfahren erfordern einen erheblichen Aufwand an Materialien
15 und Zeit und häufig an hohen Kosten.

C. Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid- und Nukleotid-Metabolismus und Verwendungen

20

Gene für den Purin- und Pyrimidin-Stoffwechsel und ihre entsprechenden Proteine sind wichtige Ziele für die Therapie von Tumorerkrankungen und Virusinfektionen. Der Begriff "Purin" oder "Pyrimidin" umfaßt stickstoffhaltige Basen, die Bestandteil der
25 Nukleinsäuren, Coenzyme und Nukleotide sind. Der Begriff "Nukleotid" beinhaltet die grundlegenden Struktureinheiten der Nukleinsäuremoleküle, die eine stickstoffhaltige Base, einen Pentose-Zucker (bei RNA ist der Zucker Ribose, bei DNA ist der Zucker D-Desoxyribose) und Phosphorsäure umfassen. Der Begriff
30 "Nukleosid" umfaßt Moleküle, die als Vorstufen von Nukleotiden dienen, die aber im Gegensatz zu den Nukleotiden keine Phosphorsäureeinheit aufweisen. Durch Hemmen der Biosynthese dieser Moleküle oder ihrer Mobilisation zur Bildung von Nukleinsäuremolekülen ist es möglich, die RNA- und DNA-Synthese zu hemmen; wird
35 diese Aktivität zielgerichtet bei kanzerogenen Zellen gehemmt, läßt sich die Teilungs- und Replikations-Fähigkeit von Tumorzellen hemmen.

Es gibt zudem Nukleotide, die keine Nukleinsäuremoleküle bilden,
40 jedoch als Energiespeicher (d.h. AMP) oder als Coenzyme (d.h. FAD und NAD) dienen.

Mehrere Veröffentlichungen haben die Verwendung dieser Chemikalien für diese medizinischen Indikationen beschrieben, wobei der
45 Purin- und/oder Pyrimidin-Metabolismus beeinflusst wird (bspw. Christopherson, R.I. und Lyons, S.D. (1990) "Potent inhibitors of de novo pyrimidine and purine biosynthesis as chemotherapeutic

agents", Med. Res. R views 10: 505-548). Untersuchungen an Enzymen, die am Purin- und Pyrimidin-Metabolismus beteiligt sind, haben sich auf die Entwicklung neuer Medikamente konzentriert, die bspw. als Immunsuppressivumittel oder Antiproliferantien verwendet werden können (Smith, J.L. "Enzymes in Nucleotide Synthesis" Curr. Opin. Struct. Biol. 5 (1995) 752-757; Biochem. Soc. Transact. 23 (1995) 877-902). Die Purin- und Pyrimidinbasen, Nukleoside und Nukleotide haben jedoch auch andere Einsatzmöglichkeiten: als Zwischenprodukte bei der Biosynthese verschiedener Feinchemikalien (z.B. Thiamin, S-Adenosyl-methionin, Folate oder Riboflavin), als Energieträger für die Zelle (bspw. ATP oder GTP) und für Chemikalien selbst, werden gewöhnlich als Geschmacksverstärker verwendet (bspw. IMP oder GMP) oder für viele medizinische Anwendungen (siehe bspw. Kuninaka, A., (1996)

15 "Nucleotides and Related Compounds in Biotechnology Bd. 6, Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim, S. 561-612). Enzyme, die am Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid- oder Nukleotid-Metabolismus beteiligt sind, dienen auch immer stärker als Ziele, gegen die Chemikalien für den Pflanzenschutz, einschließlich Fungiziden, Herbiziden und

20 Insektiziden entwickelt werden.

Der Metabolismus dieser Verbindungen in Bakterien ist charakterisiert worden (für Übersichten siehe bspw. Zalkin, H. und Dixon, J.E. (1992) "De novo purin nucleotide biosynthesis" in Progress

25 in Nucleic Acids Research and Molecular biology, Bd. 42, Academic Press, S. 259-287; und Michal, G. (1999) "Nucleotides and Nucleosides"; Kap. 8 in : Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, Wiley, New York). Der Purin-Metabolismus, das Objekt intensiver Forschung, ist für das normale

30 Funktionieren der Zelle essentiell. Ein gestörter Purin-Metabolismus in höheren Tieren kann schwere Erkrankungen verursachen, bspw. Gicht. Die Purinnukleotide werden über eine Reihe von Schritten über die Zwischenverbindung Inosin-5'-phosphat (IMP) aus Ribose-5-phosphat synthetisiert, was zur Produktion von

35 Guanosin-5'-monophosphat (GMP) oder Adenosin-5'-monophosphat (AMP) führt, aus denen sich die als Nukleotide verwendeten Triphosphatformen leicht herstellen lassen. Diese Verbindungen werden auch als Energiespeicher verwendet, so daß ihr Abbau Energie für viele verschiedene biochemische Prozesse in der Zelle liefert.

40 fert. Die Pyrimidinbiosynthese erfolgt über die Bildung von Uridin-5'-monophosphat (UMP) aus Ribose-5-phosphat. UMP wiederum wird in Cytidin-5'-triphosphat (CTP) umgewandelt. Die Desoxyformen sämtlicher Nukleotide werden in einer Einschnitt-Reduktionsreaktion aus der Diphosphat-Riboseform des Nukleotides zur

45 Diphosphat-Desoxyriboseform des Nukleotides hergestellt. Nach d r

Phosphorylierung können diese Moleküle an der DNA-Synthese teilnehmen.

D. Trehalose-Metabolismus und Verwendungen

5

Trehalose besteht aus zwei Glucosemolekülen, die über α, α -1,1-Bindung miteinander verknüpft sind. Sie wird gewöhnlich in der Nahrungsmittelindustrie als Süßstoff, als Additiv für getrocknete oder gefrorene Nahrungsmittel sowie in Getränken verwendet. Sie wird jedoch auch in der pharmazeutischen Industrie, der Kosmetik- und Biotechnologie-Industrie angewendet (s. bspw. Nishimoto et al., (1998) US-Patent Nr. 5 759 610; Singer, M.A. und Lindquist, S. Trends Biotech. 16 (1998) 460-467; Paiva, C.L.A. und Panek, A.D. Biotech Ann. Rev. 2 (1996) 293-314; und Shiosaka, M.J. Japan 15 172 (1997) 97-102). Trehalose wird durch Enzyme von vielen Mikroorganismen produziert und auf natürliche Weise in das umgebende Medium abgegeben, aus dem sie durch im Fachgebiet bekannte Verfahren gewonnen werden kann.

20 II. Erfindungsgemäße Elemente und Verfahren

Die vorliegende Erfindung beruht zumindest teilweise auf der Entdeckung von neuen Molekülen, die hier als G6PD-Nukleinsäure- und -Protein-Moleküle bezeichnet werden und an der Aufnahme energiereicher Kohlenstoffmoleküle (z.B. Glucose, Saccharose und Fructose) in *C. glutamicum* beteiligt sind und auch an einem oder mehreren intrazellulären Signaltransduktionswegen in diesen Mikroorganismen beteiligt sein können. Bei einer Ausführungsform importieren die G6PD-Moleküle energiereiche Kohlenstoffmoleküle in die 30 Zelle, wo die durch ihren Abbau erzeugte Energie zum Antreiben energetisch weniger begünstigter biochemischer Reaktionen eingesetzt wird. Ihre Abbauprodukte können als Zwischenprodukte oder Vorstufen für eine Reihe anderer Stoffwechselwege eingesetzt werden. Bei einer anderen Ausführungsform können die G6PD-Moleküle 35 an einem oder mehreren intrazellulären Signaltransduktionswegen teilnehmen, wobei die Gegenwart einer modifizierten Form eines G6PD-Moleküls (z.B. ein phosphoryliertes G6PD-Protein) an einer Signaltransduktionskaskade teilnehmen kann, die einen oder mehrere Zellvorgänge reguliert. Die Aktivität der erfindungsgemäßen 40 G6PD-Moleküle hat bei einer bevorzugten Ausführungsform eine Auswirkung auf die Produktion einer gewünschten Feinchemikalie durch diesen Organismus. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform haben die erfindungsgemäßen G6PD-Moleküle eine modulierte Aktivität, so daß die Ausbeute, Produktion oder Effizienz der 45 Produktion von einer oder mehreren Feinchemikalien aus *C. glutamicum* ebenfalls moduliert sind.

13

Die erfindungsgemäßen G6PD-Moleküle sind in einer anderen Ausführungsform befähigt, die Produktion eines gewünschten Moleküls, wie einer Feinchemikalie, in einem Mikroorganismus, wie *C. glutamicum*, zu modulieren. Mit Hilfe von Genrekombinationstechniken lassen sich ein oder mehrere erfindungsgemäße G6PD-Proteine derart manipulieren, daß ihre Funktion moduliert ist. Bspw. kann ein Protein, das am G6PD-vermittelten Import von Glucose beteiligt ist, so verändert werden, daß es optimale Aktivität aufweist, und das G6PD-System für den Import von Glucose kann somit größere Mengen Glucose in die Zelle befördern. Glucosemoleküle werden nicht nur als Energiequelle für energetisch ungünstige biochemische Reaktionen, wie die Biosynthese von Feinchemikalien verwendet, sondern auch als Vorstufen und Zwischenprodukte bei einer Reihe von Feinchemikalien-Biosynthesewegen (bspw. wird Serin aus 3-Phosphoglycerat synthetisiert). In jedem Fall läßt sich die Gesamtausbeute oder die Produktionsrate einer dieser gewünschten Feinchemikalien erhöhen, und zwar durch Erhöhen der Energie, die verfügbar ist, damit diese Produktion stattfindet, oder durch Vergrößern der Verfügbarkeit der Verbindungen, die nötig sind, damit diese Produktion stattfindet.

Als Ausgangspunkt zur Herstellung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen eignet sich das Genom eines *Corynebacterium glutamicum*-Stammes, der von der American Type Culture Collection unter der Bezeichnung ATCC 13032 erhältlich ist.

Von diesen Nukleinsäuresequenzen lassen sich durch die in Tabelle 1 bezeichneten Veränderungen die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen mit üblichen Verfahren herstellen.

Das erfindungsgemäße G6PD-Protein oder ein biologisch aktiver Abschnitt oder Fragmente davon können am Transport von energiereichen kohlenstoffhaltigen Molekülen, wie Glucose, in *C. glutamicum* oder an einer intrazellulären Signaltransduktion in diesem Mikroorganismus beteiligt sein, oder können eine oder mehrere der in Tabelle 1 aufgeführten Aktivitäten aufweisen.

In den nachstehenden Unterabschnitten sind verschiedene Aspekte der Erfindung ausführlicher beschrieben:

A. Isolierte Nukleinsäuremoleküle

Ein Aspekt der Erfindung betrifft isolierte Nukleinsäuremoleküle, die G6PD-Polypeptide oder biologisch aktive Abschnitte davon codieren; sowie Nukleinsäurefragmente, die zur Verwendung als Hybridisierungssonden oder Primer zur Identifizierung oder Amplifizierung von G6PD-codierenden Nukleinsäuren (z.B. G6PD-DNA) hin-

reichen. Der Begriff "Nukleinsäuremolekül" soll DNA-Moleküle (z.B. cDNA oder genomische DNA) und RNA-Moleküle (z.B. mRNA) so-
wie DNA- oder RNA-Analoga, die mittels Nukleotidanaloga erzeugt werden, umfassen. Dieser Begriff umfaßt zudem die am 3'- und am 5'-Ende des codierenden Bereichs gelegene untranslatierte Sequenz: mindestens etwa 100 Nukleotide der Sequenz stromaufwärts des 5'-Endes des codierenden Bereichs und mindestens etwa 20 Nukleotide der Sequenz stromabwärts des 3'-Endes des codierenden Bereichs. Das Nukleinsäuremolekül wird aus anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle doppelsträngig oder doppelsträngig sein, aber vorzugsweise eine doppelsträngige DNA. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül hat vorzugsweise keine Zugabe von Sequenzen, die die Nukleinsäure in der Natur flankieren (bspw. Sequenzen, die sich am 5'- bzw. 3'-Ende des Organismus, aus dem die Nukleinsäure stammt, genomische DNA des Organismus, die die Nukleinsäure flankieren kann bspw. das isolierte G6PD-Nukleinsäuremolekül weniger als etwa 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb oder 0,1 kb der Nukleotidsequenzen, wie ein cDNA-Molekül kann überdies im Stamm in der genomischen DNA der Zelle, aus der die Nukleinsäure stammt (bspw. eine *C. glutamicum*-Zelle), aus der die Nukleinsäuremolekül wesentlichen frei von chemischen Vorstufen oder anderen hergestellten Kulturmedium sein, wenn es chemisch synthetisiert wird. mikalien sein, wenn es chemisch synthetisiert wird.

Ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, bspw. eine Nukleinsäuremolekül mit einer Nukleotidsequenz aus Anhang A oder ein Abschnitt davon, kann mittels molekularbiologischer Standard-Techniken und der hier bereitgestellten Sequenzinformation hergestellt werden. Bspw. kann eine *C. glutamicum*-G6PD-cDNA aus einer *C. glutamicum*-Bank isoliert werden, indem eine vollständige Sequenz aus Anhang A oder ein Abschnitt davon als Hybridisierungssonde und Standard-Hybridisierungstechniken (wie bspw. beschrieben in Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989) verwendet werden. Überdies läßt sich ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine vollständige Sequenz aus Anhang A oder ein Abschnitt davon, durch Polymerasekettenreaktion isolieren, wobei die Oligonukleotidprimer, die auf der Basis dieser Sequenz erstellt wurden, verwendet werden (z.B. kann ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine vollständige Sequenz aus Anhang A oder einen Abschnitt davon, durch Polymerasekettenreaktion isoliert werden, indem Oligonukleotidprimer verwendet werden, die auf der

15

- Basis dies r gleichen Sequenz aus Anhang A erstellt worden sind). Bspw. läßt sich mRNA aus normalen Endothelzellen isolieren (bspw. durch das Guanidiniumthiocyanat-Extraktionsverfahren von Chirgwin et al. (1979) Biochemistry 18: 5294-5299) und die cDNA kann
- 5 mittels reverser Transkriptase (bspw. Moloney-MLV-Reverse-Transkriptase, erhältlich bei Gibco/BRL, Bethesda, MD, oder AMV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL) hergestellt werden. Synthetische Oligonukleotidprimer für die Amplifizierung via Polymeraseketterreaktion lassen sich auf der Basis einer der in Anhang A gezeigten Nukleotidsequenzen erstellen. Eine erfindungsgemäße Nukleinsäure kann
- 10 mittels cDNA oder alternativ genomischer DNA als Matrize und geeigneten Oligonukleotidprimern gemäß PCR-Standard-Amplifikations-techniken amplifiziert werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure
- 15 kann in einen geeigneten Vektor kloniert werden und durch DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. Oligonukleotide, die einer G6PD-Nukleotidsequenz entsprechen, können durch Standard-Syntheseverfahren, bspw. mit einem automatischen DNA-Synthesegerät, hergestellt werden.
- 20 Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül eine der in Anhang A aufgeführten Nukleotidsequenzen.
- 25 Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül ein zu einer der in Anhang A gezeigten Nukleotidsequenzen komplementäres Nukleinsäuremolekül oder einen Abschnitt davon, wobei es sich um ein Nukleinsäuremolekül handelt, das zu einer der in Anhang A gezeigten
- 30 Nukleotidsequenzen hinreichend komplementär ist, daß es mit einer der in Anhang A angegebenen Sequenzen hybridisieren kann, wodurch ein stabiler Duplex entsteht.
- Bei einer Ausführungsform codiert das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül ein Protein oder einen Abschnitt davon, der eine
- 35 Aminosäuresequenz umfaßt, die hinreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz von Anhang B ist, daß das Protein oder ein Abschnitt davon weiterhin am Transport von energiereichen Kohlenstoffmolekülen (wie Glucose) in *C. glutamicum* und auch an einem oder mehreren intrazellulären Signaltransduktionswegen beteiligt sein
- 40 kann. Wie hier verwendet, betrifft der Begriff "hinreichend homolog" Proteine oder Abschnitte davon, deren Aminosäuresequenzen eine minimale Anzahl identischer oder äquivalenter Aminosäurereste (bspw. ein Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkett wie ein Aminosäurerest in einer der Sequenzen von Anhang B) zu einer Aminosäuresequenz aus Anhang B aufweisen, so daß das Protein oder ein Abschnitt davon energiereiche Kohlenstoffmole-

küle, wie Glucose, in *C. glutamicum* transportieren kann und zudem an der intrazellulären Signaltransduktion in diesem Mikroorganismus beteiligt sein kann. Proteinbestandteile dieser Stoffwechselwege transportieren, wie hier beschrieben, energiereiche kohlenstoffhaltige Moleküle wie Glucose in *C. glutamicum* und können auch an der intrazellulären Signaltransduktion in diesem Mikroorganismus beteiligt sein. Beispiele dieser Aktivitäten sind ebenfalls hier beschrieben. Somit betrifft die "Funktion eines G6PD-Proteins" das vollständige Funktionieren und/oder die Regulation von einem oder mehreren Zuckertransport-Wegen auf Phosphoenolpyruvat-Basis. In Tabelle 1 sind Beispiele der G6PD-Proteinaktivitäten angegeben.

Abschnitte von Proteinen, die von den erfindungsgemäßen G6PD-Nukleinsäuremolekülen codiert werden, sind vorzugsweise biologisch aktive Abschnitte von einem der G6PD-Proteine. Der Begriff "biologisch aktiver Abschnitt eines G6PD-Proteins", wie er hier verwendet wird, soll einen Abschnitt, bspw. eine Domäne oder ein Motiv, eines G6PD-Proteins umfassen, die/das energiereiche kohlenstoffhaltige Moleküle, wie Glucose, in *C. glutamicum* transportieren kann, oder an der intrazellulären Signaltransduktion in diesem Mikroorganismus beteiligt sein kann, oder eine in Tabelle 1 angegebene Aktivität aufweist. Zur Bestimmung, ob ein G6PD-Protein oder ein biologisch aktiver Abschnitt davon am Transport von energiereichen kohlenstoffhaltigen Molekülen, wie Glucose, in *C. glutamicum* oder an der intrazellulären Signaltransduktion in diesem Mikroorganismus beteiligt sein kann, kann ein Test der enzymatischen Aktivität durchgeführt werden. Diese Testverfahren, wie eingehend beschrieben in Beispiel 8 des Beispiels, sind dem Fachmann geläufig.

Zusätzlich zu natürlich vorkommenden Varianten der G6PD-Sequenz, die in der Population existieren können, ist der Fachmann sich ebenfalls dessen bewußt, daß Änderungen durch Mutation in eine Nukleotidsequenz von Anhang A eingebracht werden können, was zur Änderung der Aminosäuresequenz des codierten G6PD-Proteins führt, ohne daß die Funktionsfähigkeit des G6PD-Proteins beeinträchtigt wird. Bspw. lassen sich Nukleotidsusbtitutionen, die an "nicht-essentiellen" Aminosäureresten zu Aminosäuresubstitutionen führen, in einer Sequenz von Anhang A herstellen. Ein "nicht-essentieller" Aminosäurerest läßt sich in einer Wildtypsequenz von einem der G6PD-Proteine (Anhang B) verändern, ohne daß die Aktivität des G6PD-Proteins verändert wird, wohingegen ein "essentieller" Aminosäurerest für die G6PD-Proteinaktivität erforderlich ist. Andere Aminosäurerest jedoch (bspw. nicht-konservierte oder lediglich semikonservierte Aminosäurereste in der Domäne mit G6PD-Aktivität) können für die Aktivität nicht essen-

tiell sein und lassen sich somit wahrscheinlich verändern, ohne daß die G6PD-Aktivität verändert wird.

Ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, das ein G6PD-Protein codiert, das zu einer Proteinsequenz aus Anhang B homolog ist, kann durch Einbringen von einer oder mehreren Nukleotidsubstitutionen, -additionen oder -deletionen in eine Nukleotidsequenz aus Anhang A erzeugt werden, so daß eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, -additionen oder -deletionen in das codierte Protein eingebracht werden. Die Mutationen können in eine der Sequenzen aus Anhang A durch Standard-Techniken eingebracht werden, wie stellergerichtete Mutagenese und PCR-vermittelte Mutagenese. Vorzugsweise werden konservative Aminosäuresubstitutionen an einer oder mehreren der vorhergesagten nicht-essentiellen Aminosäureresten eingeführt. Bei einer "konservativen Aminosäuresubstitution" wird der Aminosäurerest durch einen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette ausgetauscht. Im Fachgebiet sind Familien von Aminosäureresten mit ähnlichen Seitenketten definiert worden. Diese Familien umfassen Aminosäuren mit basischen Seitenketten (z.B. Lysin, Arginin, Histidin), sauren Seitenketten (z.B. Asparaginsäure, Glutaminsäure), ungeladenen polaren Seitenketten (z.B. Glycin, Asparagin, Glutamin, Serin, Threonin, Tyrosin, Cystein), nicht-polaren Seitenketten, (bspw. Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Methionin, Tryptophan), beta-verzweigten Seitenketten (z.B. Threonin, Valin, Isoleucin) und aromatischen Seitenketten (z.B. Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, Histidin). Ein vorhergesagter nicht-essentieller Aminosäurerest in einem G6PD-Protein wird somit vorzugsweise durch einen anderen Aminosäurerest der gleichen Seitenkettenfamilie ausgetauscht. In einer weiteren Ausführungsform können die Mutationen alternativ zufallsgemäß über die gesamte oder einen Teil der G6PD-codierenden Sequenz eingebracht werden, bspw. durch Sättigungsmutagenese, und die resultierenden Mutanten können auf die hier beschriebene G6PD-Aktivität untersucht werden, um Mutanten zu identifizieren, die eine G6PD-Aktivität beibehalten. Nach der Mutagenese von einer der Sequenzen aus Anhang A kann das codierte Protein rekombinant exprimiert werden, und die Aktivität des Proteins kann bspw. mit den hier beschriebenen Tests (siehe Beispiel 8 des Beispiels) bestimmt werden.

40

B. Rekombinante Expressionsvektoren und Wirtszellen

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Vektoren, vorzugsweise Expressionsvektoren, die eine Nukleinsäure enthalten, die ein G6PD-Protein (oder einen Abschnitt davon) codiert. Wie hier verwendet betrifft der Begriff "Vektor" ein Nukleinsäuremolekül, das eine andere Nukleinsäure transportieren kann, an welche s

45

gebunden ist. Ein Vektortyp ist ein "Plasmid", was für eine zirkuläre doppelsträngige DNA-Schleife steht, in die zusätzlichen DNA-Segmente ligiert werden können. Ein weiterer Vektortyp ist ein viraler Vektor, wobei zusätzliche DNA-Segmente in das virale Genom ligiert werden können. Bestimmte Vektoren können in einer Wirtszelle, in die sie eingebracht worden sind, autonom replizieren (bspw. Bakterienvektoren, mit bakteriellem Replikationsursprung und episomale Säugetiervektoren). Andere Vektoren (z.B. nicht-episomale Säugetiervektoren) werden in das Genom einer Wirtszelle beim Einbringen in die Wirtszelle integriert und dadurch zusammen mit dem Wirtsgenom repliziert. Zudem können bestimmte Vektoren die Expression von Genen, mit denen sie funktionsfähig verbunden sind, steuern. Diese Vektoren werden als "Expressionsvektoren" bezeichnet. Gewöhnlich haben die Expressionsvektoren, die bei DNA-Rekombinationstechniken verwendet werden, die Form von Plasmiden. In der vorliegenden Beschreibung können "Plasmid" und "Vektor" austauschbar verwendet werden, da das Plasmid die am häufigsten verwendete Vektorform ist. Die Erfindung soll diese anderen Expressionsvektorformen, wie virale Vektoren (bspw. replikationsdefiziente Retroviren, Adenoviren und adenoverwandte Viren), die ähnliche Funktionen ausüben, umfassen.

Der erfindungsgemäße rekombinante Expressionsvektor umfaßt eine erfindungsgemäße Nukleinsäure in einer Form, die sich zur Expression der Nukleinsäure in einer Wirtszelle eignet, was bedeutet, daß die rekombinanten Expressionsvektoren eine oder mehrere regulatorische Sequenzen, ausgewählt auf der Basis der zur Expression zu verwendenden Wirtszellen, die mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz funktionsfähig verbunden ist, umfaßt. In einem rekombinanten Expressionsvektor bedeutet "funktionsfähig verbunden", daß die Nukleotidsequenz von Interesse derart an die regulatorische(n) Sequenz(en) gebunden ist, daß die Expression der Nukleotidsequenz möglich ist (bspw. in einem In-vitro-Transkriptions-/Translationssystem oder in einer Wirtszelle, wenn der Vektor in die Wirtszelle eingebracht ist). Der Begriff "regulatorische Sequenz" soll Promotoren, Enhancer und andere Expressionskontrollelemente (bspw. Polyadenylierungssignale) umfassen. Diese regulatorischen Sequenzen sind bspw. beschrieben in Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Regulatorische Sequenzen umfassen solche, die die konstitutive Expression einer Nukleotidsequenz in vielen Wirtszelltypen steuern, und solche, die die direkte Expression der Nukleotidsequenz nur in bestimmten Wirtszellen steuern. Der Fachmann ist sich dessen bewußt, daß die Gestaltung eines Expressionsvektors von Faktoren abhängen kann, wie der Wahl der zu transformierenden Wirtszelle, dem Ausmaß der Expression des gewünschten Proteins usw. Die erfindungsgemäßen Expressions-

vektoren können in die Wirtszellen eingebracht werden, so daß dadurch Proteine oder Peptide, einschließlich Fusionsproteinen oder -peptiden, die von den Nukleinsäuren, wie hier beschrieben, codiert werden, hergestellt werden (bspw. G6PD-Proteine, mutante 5 Formen von G6PD-Proteinen, Fusionsproteine, usw.).

Die erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektoren können zur Expression von G6PD-Proteinen in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen ausgestaltet sein. Bspw. können G6PD-Gene in 10 bakteriellen Zellen, wie *C. glutamicum*, Insektenzellen (mit Baculovirus-Expressionsvektoren), Hefe- und anderen Pilzzellen (siehe Romanos, M.A. et al. (1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", Yeast 8: 423-488; van den Hondel, C.A.M.J.J. et al. (1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi" in: 15 More Gene Manipulations in Fungi, J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsg., S. 396-428: Academic Press: San Diego; und van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi. in: Applied Molecular Genetics of Fungi, Peberdy, J.F. et al., Hrsg, S. 1-28, Cambridge 20 University Press: Cambridge), Algen- und vielzelligen Pflanzenzellen (siehe Schmidt, R. und Willmitzer, L. (1988) "High efficiency *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* leaf and cotyledon explants" Plant Cell Rep.: 583-586) oder Säugetierzellen exprimiert werden. Geeignete Wirtszellen werden weiter erörtert in Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Der rekombinante Expressionsvektor kann alternativ, bspw. mit T7-Promotorregulatorischen Sequenzen und T7-Polymerase, in vitro transkribiert und translatiert werden.

30 Die Expression von Proteinen in Prokaryonten erfolgt meist mit Vektoren, die konstitutive oder induzierbare Promotoren enthalten, die die Expression von Fusions- oder Nicht-Fusionsproteinen steuern. Fusionsvektoren steuern eine Reihe von Aminosäuren zu 35 einem darin codierten Protein, gewöhnlich am Aminoterminal des rekombinanten Proteins, bei. Diese Fusionsvektoren haben gewöhnlich drei Aufgaben: 1) die Verstärkung der Expression von rekombinantem Protein; 2) die Erhöhung der Löslichkeit des rekombinanten Proteins; und 3) die Unterstützung der Reinigung des 40 rekombinanten Proteins durch Wirkung als Ligand bei der Affinitätsreinigung. Bei Fusions-Expressionsvektoren wird oft eine proteolytische Spaltstelle an der Verbindungsstelle der Fusions- einheit und des rekombinanten Proteins eingebracht, so daß die Trennung des rekombinanten Proteins von der Fusionseinheit nach 45 der Reinigung des Fusionsproteins möglich ist. Diese Enzyme und

ihre entsprechenden Erkennungssequenzen umfassen Faktor Xa, Thrombin und Enterokinase.

Übliche Fusionsexpressionsvektoren umfassen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. und Johnson, K.S. (1988) Gene 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT 5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), bei denen Glutathion-S-Transferase (GST), Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert wird. Bei einer Ausführungsform ist die codierende Sequenz des G6PD-Proteins in einen pGEX-Expressionsvektor kloniert, so daß ein Vektor erzeugt wird, der ein Fusionsprotein codiert, umfassend vom N-Terminus zum C-Terminus, GST - Thrombin-Spaltstelle - X-Protein. Das Fusionsprotein kann durch Affinitätschromatographie mittels Glutathion-Agarose-Harz gereinigt werden. Das rekombinante G6PD-Protein, das nicht mit GST fusioniert ist, kann durch Spaltung des Fusionsproteins mit Thrombin gewonnen werden.

Beispiele geeigneter induzierbarer Nicht-Fusions-Expressionsvektoren aus E. coli umfassen pTrc (Amann et al., (1988) Gene 69: 301 - 315) und pET 11d (Studier et al. Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89). Die Zielgenexpression aus dem pTrc-Vektor beruht auf der Transkription durch Wirts-RNA-Polymerase von einem Hybrid-trp-lac-Fusionspromotor. Die Zielgenexpression aus dem pET11d-Vektor beruht auf der Transkription von einem T7-gnl0-lac-Fusions-Promotor, die von einer coexprimierten viralen RNA-Polymerase (T7 gnl) vermittelt wird. Diese virale Polymerase wird von den Wirtsstämmen BL 21 (DE3) oder HMS174 (DE3) von einem resistenten λ -Prophagen geliefert, der ein T7 gnl-Gen unter der Transkriptionskontrolle des lacUV 5-Promotors birgt.

Eine Strategie zur Maximierung der Expression des rekombinanten Proteins ist die Expression des Proteins in einem Wirtsbakterium, dessen Fähigkeit zur proteolytischen Spaltung des rekombinanten Proteins gestört ist (Gottesman, S. Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 119-128). Eine weitere Strategie ist die Veränderung der Nukleinsäuresequenz der in einen Expressionsvektor zu inserierenden Nukleinsäure, so daß die einzelnen Codons für jede Aminosäure diejenigen sind, die vorzugsweise in einem zur Expression ausgewählten Bakterium, wie C. glutamicum, verwendet werden (Wada et al. (1992) Nucleic Acids Res. 20: 2111 - 2118). Diese Veränderung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen erfolgt durch Standard-DNA-Synthesetechniken.

- Bei einer weiteren Ausführungsform ist der G6PD-Proteinexpressionsvektor ein Hef -Expressionsvektor. Beispiele für Vektoren zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae* umfassen pYepSec1 (Baldari et al., (1987) *Embo J.* 6: 229-234), pMFa (Kurjan und
5 Herskowitz (1982) *Cell* 30: 933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) *Gene* 54: 113 - 123) sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in anderen Pilzen, wie filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben
10 ben sind in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: *Applied Molecular Genetics of fungi*, J.F. Peberdy et al., Hrsg., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.
- 15 Alternativ können die erfindungsgemäßen G6PD-Proteine in Insektenzellen unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren exprimiert werden. Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (bspw. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al., (1983) *Mol.*
20 *Cell Biol.* 3: 2156-2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) *Virology* 170: 31-39).

- In einer weiteren Ausführungsform können die erfindungsgemäßen G6PD-Proteine in einzelligen Pflanzenzellen (wie Algen) oder in
25 Pflanzenzellen höherer Pflanzen (bspw. Spermatophyten, wie Feldfrüchte) exprimiert werden. Beispiele für Pflanzen-Expressionsvektoren umfassen solche, die eingehend beschrieben sind in: Becker, D., Kemper, E., Schell, J. und Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to
30 the left border", *Plant Mol. Biol.* 20: 1195-1197; und Bevan, M.W. (1984) "Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation", *Nucl. Acids Res.* 12: 8711-8721.

- In einer weiteren Ausführungsform wird eine erfindungsgemäße
35 Nukleinsäure in Säugetierzellen mit einem Säugetier-Expressionsvektor exprimiert.. Beispiele für Säugetier-Expressionsvektoren umfassen pCDM8 (Seed, B. (1987) *Nature* 329:840) und pMT2PC (Kaufman et al. (1987) *EMBO J.* 6: 187-195). Bei der Verwendung in Säugetierzellen werden die Kontrollfunktionen des Expressionsvektors
40 oft von viralen regulatorischen Elementen bereitgestellt. Gemeinhin verwendete Promotoren stammen bspw. aus Polyoma, Adenovirus2, Cytomegalievirus und Simian Virus 40. Für weitere geeignete Expressionssysteme für prokaryotische und eukaryotische Zellen, siehe die Kapitel 16 und 17 aus Sambrook, J., Fritsch, E.F. und
45 Maniatis, T., *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2. Auflage,

Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Bei einer weiteren Ausführungsform kann der rekombinante Säugetier-Expressionsvektor die Expression der Nukleinsäure vorzugsweise in einem bestimmten Zelltyp bewirken (bspw. werden gewebespezifische regulatorische Elemente zur Expression der Nukleinsäure verwendet). Gewebespezifische regulatorische Elemente sind im Fachgebiet bekannt. Nicht-einschränkende Beispiele für geeignete gewebespezifische Promotoren umfassen den Albuminpromotor (leberspezifisch; Pinkert et al. (1987) Genes Dev. 1: 268-277), lymphoid-spezifische Promotoren (Calame und Eaton (1988) Adv. Immunol. 43: 235-275), insbesondere Promotoren von T-Zellrezeptoren (Winoto und Baltimore (1989) EMBO J. 8: 729-733) und Immunglobulinen (Banerji et al. (1983) Cell 33: 729-740; Queen und Baltimore (1983) Cell 33: 741-748), neuronspezifische Promotoren (bspw. Neurofilament-Promotor; Byrne und Ruddle (1989) PNAS 86: 5473-5477), pankreasspezifische Promotoren (Edlund et al., (1985) Science 230: 912-916) und milchdrüsenspezifische Promotoren (bspw. Milchserum-Promotor; US-Patent Nr. 4 873 316 und europäische Patentanmeldungsveröffentlichung Nr. 264 166). Entwicklungsregulierte Promotoren sind ebenfalls umfaßt, bspw. die Maus-hox-Promotoren (Kessel und Gruss (1990) Science 249: 374-379) und der α -Fetoprotein-Promotor (Campes und Tilghman (1989) Genes Dev. 3: 537-546).

Die Erfindung stellt zudem einen rekombinanten Expressionsvektor bereit, umfassend ein erfindungsgemäßes DNA Molekül, das in Antisense-Richtung in den Expressionsvektor kloniert ist. Dies bedeutet, daß das DNA-Molekül derart mit einer regulatorischen Sequenz funktionsfähig verbunden ist, daß die Expression (durch Transkription des DNA-Moleküls) eines RNA-Moleküls, das zur G6PD-mRNA antisense ist, möglich ist. Es können regulatorische Sequenzen ausgewählt werden, die funktionsfähig an eine in Antisense-Richtung klonierte Nukleinsäure gebunden sind und die die kontinuierliche Expression des Antisense-RNA-Moleküls in einer Vielzahl von Zelltypen steuern, bspw. können virale Promotoren und/oder Enhancer oder regulatorische Sequenzen ausgewählt werden, die die konstitutive, gewebespezifische oder zelltypspezifische Expression von Antisense-RNA steuern. Der Antisense-Expressionsvektor kann in Form eines rekombinanten Plasmids, Phagemids oder attenuierten Virus vorliegen, in dem Antisense-Nukleinsäuren unter der Kontrolle eines hochwirksamen regulatorischen Bereichs produziert werden, dessen Aktivität durch den Zelltyp bestimmt wird, in den der Vektor eingebracht wird. Für eine Diskussion der Regulation der Genexpression mittels Antisense-Genen, siehe Weintraub, H. et

al., Antisense-RNA as a molecular tool for genetic analysis,
Reviews - Trends in Genetics, Bd. 1(1) 1986.

- Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Wirtszellen, in
5 die ein erfindungsgemäßer rekombinanter Expressionsvektor einge-
bracht worden ist. Die Begriffe "Wirtszelle" und "rekombinante
Wirtszelle" werden hier untereinander austauschbar verwendet. Es
ist selbstverständlich, daß diese Begriffe nicht nur eine be-
stimmte Zielzelle, sondern auch die Nachkommen oder potentiellen
10 Nachkommen dieser Zelle betreffen. Da in aufeinanderfolgenden
Generationen aufgrund von Mutation oder Umwelteinflüssen be-
stimmte Modifikationen auftreten können, sind diese Nachkommen
nicht unbedingt mit der Parentalzelle identisch, sind jedoch im
Umfang des Begriffs, wie er hier verwendet wird, noch umfaßt.
- 15 Eine Wirtszelle kann eine prokaryotische oder eukaryotische Zelle
sein. Bspw. kann ein G6PD-Protein in Bakterienzellen, wie *C. glu-*
tamicum, Insektenzellen, Hefe- oder Säugetierzellen (wie Ovarzel-
len des chinesischen Hamsters (CHO) oder COS-Zellen) expriert
20 werden. Andere geeignete Wirtszellen sind dem Fachmann geläufig.
Mikroorganismen, die mit *Corynebacterium glutamicum* verwandt sind
und sich geeignet als Wirtszellen für die erfindungsgemäßen
Nukleinsäure- und Proteinmoleküle verwenden lassen, sind in Ta-
belle 3 aufgeführt.
- 25 Durch herkömmliche Transformations- oder Transfektionsverfahren
läßt sich Vektor-DNA in prokaryotische oder eukaryotische Zellen
einbringen. Die Begriffe "Transformation" und "Transfektion", wie
sie hier verwendet werden, sollen eine Vielzahl von im Stand der
30 Technik bekannten Verfahren zum Einbringen fremder Nukleinsäure
(bspw. DNA) in eine Wirtszelle umfassen, einschließlich Calcium-
phosphat- oder Calciumchlorid-Coprazipitation, DEAE-Dextran-ver-
mittelte Transfektion, Lipofektion oder Elektroporation. Geeig-
nete Verfahren zur Transformation oder Transfektion von Wirtszel-
35 len lassen sich nachlesen in Sambrook et al. (Molecular Cloning:
A Laboratory Manual. 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold
Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) und
anderen Labor-Handbüchern.
- 40 Für die stabile Transfektion von Säugetierzellen ist bekannt, daß
je nach verwendetem Expressionsvektor und verwendeter Transfektio-
onstechnik nur ein kleiner Teil der Zellen die fremde DNA in ihr
Genom integriert. Zur Identifizierung und Selektion dieser Inte-
granten wird gewöhnlich ein Gen, das einen selektierbaren Marker
45 (z.B. Resistenz gegen Antibiotika) codiert, zusammen mit dem Gen
von Interesse in die Wirtszellen eingebracht. Bevorzugte sel k-
tierbare Marker umfassen solche, die die Resistenz g gen Medika-

mente, wie G418, Hygromycin und Methotrexat, verleihen. Eine Nukleinsäure, die einen selektierbaren Marker codiert, kann in eine Wirtszelle auf dem gleichen Vektor eingebracht werden, wie derjenige, der ein G6PD-Protein codiert, oder kann auf einem gesonderten Vektor eingebracht werden. Zellen, die mit der eingebrachten Nukleinsäure stabil transfiziert worden sind, können durch Medikamentenselektion identifiziert werden (z.B. Zellen, die den selektierbaren Marker integriert haben, überleben, wohingegen die anderen Zellen sterben).

10

Zur Erzeugung eines homolog rekombinierten Mikroorganismus wird ein Vektor hergestellt, der zumindest einen Abschnitt eines G6PD-Gens enthält, in den eine Deletion, Addition oder Substitution eingebracht worden ist, um das G6PD-Gen zu verändern, bspw. funktionell zu disruptieren. Dieses G6PD-Gen ist vorzugsweise ein *Corynebacterium glutamicum*-G6PD-Gen, jedoch kann ein Homologon von einem verwandten Bakterium oder sogar von einer Säugetier-, Hefe- oder Insektenquelle verwendet werden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist der Vektor derart ausgestaltet, daß das endogene G6PD-Gen bei homologer Rekombination funktionell disruptiert ist (d.h. nicht länger ein funktionelles Protein codiert, ebenfalls bezeichnet als "Knockout"-Vektor). Der Vektor kann alternativ derart ausgestaltet sein, daß das endogene G6PD-Gen bei homologer Rekombination mutiert oder anderweitig verändert ist, jedoch noch das funktionelle Protein codiert (z.B. kann der stromaufwärts gelegene regulatorische Bereich derart verändert sein, daß dadurch die Expression des endogenen G6PD-Proteins verändert wird.). Der veränderte Abschnitt des G6PD-Gens ist im homologen Rekombinationsvektor an seinem 5'- und 3'-Ende von zusätzlicher Nukleinsäure des G6PD-Gens flankiert, die eine homologe Rekombination zwischen dem exogenen G6PD-Gen, das von dem Vektor getragen wird, und einem endogenen G6PD-Gen in einem Mikroorganismus, ermöglicht. Die zusätzliche flankierende G6PD-Nukleinsäure ist für eine erfolgreiche homologe Rekombination mit dem endogenen Gen hinreichend lang. Gewöhnlich enthält der Vektor mehrere Kilobasen flankierende DNA (sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende) (siehe z.B. Thomas, K.R. und Capecchi, M.R. (1987) Cell 51: 503 für eine Beschreibung von homologen Rekombinationsvektoren). Der Vektor wird in einen Mikroorganismus (z.B. durch Elektroporation) eingebracht, und Zellen, in denen das eingebrachte G6PD-Gen mit dem endogenen G6PD-Gen homolog rekombiniert ist, werden unter Verwendung im Fachgebiet bekannter Verfahren selektiert.

Bei einer anderen Ausführungsform können rekombinante Mikroorganismen produziert werden, die ausgewählte Systeme enthalten, die eine regulierte Expression des eingebrachten Gens ermöglichen. Der Einschluß eines G6PD-Gens in einem Vektor unter der Kontrolle

des Lac-Operons ermöglicht z.B. die Expression des G6PD-Gens nur in Gegenwart von IPTG. Diese regulatorischen Systeme sind im Fachgebiet bekannt.

- 5 Eine erfindungsgemäße Wirtszelle, wie eine prokaryotische oder eukaryotische Wirtszelle in Kultur, kann zur Produktion (d.h. Expression) eines G6PD-Proteins verwendet werden. Die Erfindung stellt zudem Verfahren zur Produktion von G6PD-Proteinen unter Verwendung der erfindungsgemäßen Wirtszellen bereit. Bei einer
- 10 Ausführungsform umfaßt das Verfahren die Anzucht der erfindungsgemäßen Wirtszelle (in die ein rekombinanter Expressionsvektor, der ein G6PD-Protein codiert, eingebracht worden ist, oder in deren Genom ein Gen eingebracht worden ist, das ein Wildtyp- oder verändertes G6PD-Protein codiert) in einem geeigneten Medium, bis
- 15 das G6PD-Protein produziert worden ist. Das Verfahren umfaßt in einer weiteren Ausführungsform das Isolieren der G6PD-Proteine aus dem Medium oder der Wirtszelle.

C. Erfindungsgemäße Verwendungen und Verfahren

20

- Die hier beschriebenen Nukleinsäuremoleküle, Proteine, Proteinhomologa, Fusionsproteine, Primer, Vektoren und Wirtszellen können in einem oder mehreren nachstehenden Verfahren verwendet werden: Identifikation von *C. glutamicum* und verwandten Organismen, Kartierung von Genomen von Organismen, die mit *C. glutamicum* verwandt sind, Identifikation und Lokalisation von *C. glutamicum*-Sequenzen von Interesse, Evolutionsstudien, Bestimmung von G6PD-Proteinbereichen, die für die Funktion notwendig sind, Modulation der Aktivität eines G6PD-Proteins; Modulation der Aktivität eines
- 25 G6PD-Wegs; und Modulation der zellulären Produktion einer gewünschten Verbindung, wie einer Feinchemikalie. Die erfindungsgemäßen G6PD-Nukleinsäuremoleküle haben eine Vielzahl von Verwendungen. Sie können zunächst zur Identifikation eines Organismus als *Corynebacterium glutamicum* oder naher Verwandten davon
- 30 verwendet werden. Sie können zudem zur Identifikation von *C. glutamicum* oder eines Verwandten davon in einer Mischpopulation von Mikroorganismen verwendet werden. Die Erfindung stellt die Nukleinsäuresequenzen einer Reihe von *C. glutamicum*-Genen bereit. Durch Sondieren der extrahierten genomischen DNA einer Kultur
- 40 einer einheitlichen oder gemischten Population von Mikroorganismen unter stringenten Bedingungen mit einer Sonde, die einen Bereich eines *C. glutamicum*-Gens umfaßt, das für diesen Organismus einzigartig ist, kann man bestimmen, ob dieser Organismus zugegen ist. *Corynebacterium glutamicum* selbst ist zwar nicht pathogen, jedoch ist es mit pathogenen Arten, wie *Corynebacterium dipthe-*

riae, verwandt. Der Nachweis eines solchen Organismus ist von signifikanter klinischer Bedeutung.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäure- und Proteinmoleküle können als Marker für spezifische Bereiche des Genoms dienen. Dies ist nicht nur beim Kartieren des Genoms, sondern auch für funktionelle Studien von *C. glutamicum*-Proteinen nützlich. Zur Identifikation des Genombereichs, an den ein bestimmtes *C. glutamicum*-DNA-bindendes Protein bindet, kann das *C. glutamicum*-Genom bspw. 10 gespalten werden, und die Fragmente mit dem DNA-bindenden Protein inkubiert werden. Diejenigen, die das Protein binden, können zusätzlich mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen, vorzugsweise mit leicht nachweisbaren Markierungen, sondiert werden; die Bindung eines solchen Nukleinsäuremoleküls an das Genomfragment ermöglicht die Lokalisation des Fragmentes auf der genomischen Karte von *C. glutamicum*, und wenn dies mehrmals mit unterschiedlichen Enzymen durchgeführt wird, erleichtert es eine rasche Bestimmung der Nukleinsäuresequenz, an die das Protein bindet. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können zudem 20 hinreichend homolog zu den Sequenzen verwandter Arten sein, so daß diese Nukleinsäuremoleküle als Marker für die Konstruktion einer genomischen Karte in verwandten Bakterien, wie *Brevibacterium lactofermentum*, dienen können.

25 Die erfindungsgemäßen G6PD-Nukleinsäuremoleküle eignen sich ebenfalls für Evolutions- und Proteinstrukturuntersuchungen. Das Zuckeraufnahmesystem, an dem die erfindungsgemäßen Moleküle beteiligt sind, wird von vielen Bakterien ausgenutzt; durch Vergleich der Sequenzen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle mit solchen, die ähnliche Enzyme aus anderen Organismen codieren, kann 30 der Evolutions-Verwandtschaftsgrad der Organismen bestimmt werden. Entsprechend ermöglicht ein solcher Vergleich die Bestimmung, welche Sequenzbereiche konserviert sind und welche nicht, was bei der Bestimmung solcher Bereiche des Proteins hilfreich sein kann, 35 die für die Enzymfunktion essentiell sind. Dieser Typ der Bestimmung ist für Proteintechnologie-Untersuchungen wertvoll und kann einen Hinweis darauf geben, welches Protein Mutagenese tolerieren kann, ohne die Funktion zu verlieren.

40 Die Manipulation der erfindungsgemäßen G6PD-Nukleinsäuremoleküle kann die Produktion von G6PD-Proteinen mit funktionellen Unterschieden zu den Wildtyp-G6PD-Proteinen bewirken. Diese Proteine können hinsichtlich ihrer Effizienz oder Aktivität verbessert werden, können in größerer Anzahl als gewöhnlich in der Zelle zu- 45 gegen sein, oder können hinsichtlich ihrer Effizienz oder Aktivität geschwächt sein.

27

Die erfindungsgemäßen G6PD-Moleküle können derart modifiziert sein, daß die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von einer oder mehreren Feinchemikalien verbessert ist. Durch derartige Modifikation eines an der Glucoseaufnahme beteiligten G6PD-Proteins, daß es optimale Aktivität aufweist, kann das Ausmaß der Glucoseaufnahme oder die Geschwindigkeit, mit der die Glucose in die Zelle befördert wird, vergrößert werden. Der Abbau von Glucose und anderen Zuckern innerhalb der Zelle stellt die Energie bereit, die zum Antrieb energetisch ungünstiger biochemischer Reaktionen, wie solchen, die an der Biosynthese von Feinchemikalien beteiligt sind, verwendet werden kann. Dieser Abbau stellt ebenfalls Zwischen- und Vorstufenmoleküle für die Biosynthese bestimmter Feinchemikalien, wie Aminosäuren, Vitamine und Cofactoren, bereit. Durch Erhöhung der Menge an intrazellulären energiereichen Kohlenstoffmolekülen durch Modifikation der erfindungsgemäßen G6PD-Moleküle kann man daher die Energie, die zur Durchführung von Stoffwechselwegen, die zur Produktion von ein oder mehreren Feinchemikalien notwendig sind, verfügbar ist, und auch die intrazellulären Pools von Metaboliten, die für eine solche Produktion notwendig sind, vergrößern. Umgekehrt kann man durch Senken des Imports eines Zuckers, dessen Abbauprodukte eine Verbindung umfassen, die nur in Stoffwechselwegen verwendet werden, die mit Stoffwechselwegen zur Produktion einer gewünschten Feinchemikalie um Enzyme, Cofaktoren oder Zwischenprodukte konkurrieren, diesen Stoffwechselweg herunterregulieren und somit vielleicht die Produktion durch den gewünschten Biosyntheseweg vergrößern.

Die erfindungsgemäßen G6PD-Moleküle können an einem oder mehreren intrazellulären Signaltransduktionswegen, die die Ausbeuten und/oder Produktionsrate von einer oder mehreren Feinchemikalien aus *C. glutamicum* beeinflussen, beteiligt sein. Bspw. werden Proteine, die für den Import von einem oder mehreren Zuckern aus dem extrazellulären Medium notwendig sind, (z.B. HPr, Enzym 1 oder ein Baustein eines Enzym-II-Komplexes) bei Anwesenheit einer hinreichenden Menge des Zuckers in der Zelle häufig posttranslational modifiziert, so daß sie nicht länger zum Import dieses Zuckers befähigt sind. Ein Beispiel hierfür erfolgt in *E. coli*, wo hohe intrazelluläre Fructose-1,6-bisphosphatspiegel die Phosphorylierung von HPr an Serin-46 bewirken, woraufhin dieses Molekül nicht länger am Transport eines Zuckers teilnehmen kann. Dieser intrazelluläre Zuckerspiegel, bei dem das Transportsystem abgeschaltet wird, kann zwar hinreichend sein, um die normale Funktion der Zelle aufrechtzuerhalten, ist jedoch für die Überproduktion der gewünschten Feinchemikalie einschränkend. Es ist daher wünschenswert, die erfindungsgemäßen G6PD-Proteine zu modifizieren, so daß sie nicht länger für eine solche negative Regulation

empfindlich sind. Dadurch werden größere intrazelluläre Konzentrationen von einem oder mehreren Zuckern, und durch Extension, eine effizientere Produktion oder größere Ausbeuten von einer oder mehreren Feinchemikalien aus Organismen, die diese mutanten 5 G6PD-Proteine enthalten, erzielt.

Diese vorstehend genannte Liste von Mutagenesestrategien für G6PD-Proteine, die erhöhte Ausbeuten einer gewünschten Verbindung bewirken sollen, soll nicht einschränkend sein; Variationen dieser Mutagenesestrategien sind dem Fachmann leicht ersichtlich. 10 Durch diese Mechanismen können die erfindungsgemäßen Nukleinsäure- und Proteinmoleküle verwendet werden, um *C. glutamicum* oder verwandte Bakterienstämme, die mutierte G6PD-Nukleinsäure- und Proteinmoleküle exprimieren, zu erzeugen, so daß die Aus- 15 beute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Verbindung verbessert wird. Die gewünschte Verbindung kann ein natürliches Produkt von *C. glutamicum* sein, welches die Endprodukte der Biosynthesewege und Zwischenprodukte natürlich vorkommender metabolischer Wege sowie Moleküle umfaßt, die im 20 Metabolismus von *C. glutamicum* nicht natürlich vorkommen, die jedoch von einem erfindungsgemäßen *C. glutamicum*-Stamm produziert werden.

Diese Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter 25 veranschaulicht, die nicht als einschränkend aufgefaßt werden sollen. Die Inhalte sämtlicher, in dieser Patentanmeldung zitierter Literaturstellen, Patentanmeldungen, Patente und veröffentlichter Patentanmeldungen sind hiermit durch Bezugnahme aufgenommen.

30 Beispiele

Beispiel 1: Präparation der gesamten genomischen DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

35

Eine Kultur von *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032) wurde über Nacht bei 30°C unter starkem Schütteln in BHI-Medium (Difco) gezüchtet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, der Überstand wurde verworfen, und die Zellen wurden in 5ml Puffer I 40 (5% des Ursprungsvolumens der Kultur - sämtliche angegebenen Volumina sind für 100 ml Kulturvolumen berechnet) resuspendiert. Die Zusammensetzung von Puffer I: 140,34 g/l Saccharose, 2,46 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 10 ml/l KH_2PO_4 -Lösung (100g/l, mit KOH eingestellt auf pH-Wert 6,7), 50 ml/l M12-Konzentrat (10 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l 45 NaCl , 2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l CaCl_2 , 0,5 g/l Hefe-Extrakt (Difco)), 10 ml/l Spurenelemente-Mischung (200 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 3 mg/l $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 30 mg/l H_3BO_3 , 20 mg/l

CoCl₂ · 6 H₂O, 1 mg/l NiCl₂ · 6 H₂O, 3 mg/l Na₂MoO₄ · 2 H₂O, 500 mg/l Komplexbildner (EDTA oder Citronensäure), 100 ml/l Vitamingemisch (0,2 ml/l Biotin, 0,2 mg/l Folsäure, 20 mg/l p-Aminobenzoessäure, 20 mg/l Riboflavin, 40 mg/l Ca-Panthothenat, 140 mg/l Nikotinsäure, 40 mg/l Pyridoxolhydrochlorid, 200 mg/l Myoinositol). Lysozym wurde in einer Endkonzentration von 2,5 mg/ml zur Suspension gegeben. Nach etwa 4 Std. Inkubation bei 37°C wurde die Zellwand abgebaut, und die erhaltenen Protoplasten wurden durch Zentrifugation geerntet. Das Pellet wurde einmal mit 5 ml Puffer I und einmal mit 5 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH-Wert 8) gewaschen. Das Pellet wurde in 4 ml TE-Puffer resuspendiert, und 0,5 ml SDS-Lösung (10%) und 0,5 ml NaCl-Lösung (5 M) wurden zugegeben. Nach Zugabe von Proteinase K in einer Endkonzentration von 200 µg/ml wurde die Suspension etwa 18 Std. bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde durch Extraktion mit Phenol, Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol und Chloroform-Isoamylalkohol mittels Standard-Verfahren gereinigt. Dann wurde die DNA durch Zugabe von 1/50 Volumen 3 M Natriumacetat und 2 Volumina Ethanol, anschließend Inkubation für 30 min bei -20°C und 30 min Zentrifugation bei 12000 U/min in einer Hochgeschwindigkeitszentrifuge mit einem SS34-Rotor (Sorvall) gefällt. Die DNA wurde in 1 ml TE-Puffer gelöst, der 20 µg/ml RNase A enthielt, und für mindestens 3 Std. bei 4°C gegen 1000 ml TE-Puffer dialysiert. Während dieser Zeit wurde der Puffer 3mal ausgetauscht. Zu Aliquots von 0,4 ml der dialysierten DNA-Lösung wurden 0,4 ml 2 M LiCl und 0,8 ml Ethanol zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei -20°C wurde die DNA durch Zentrifugation gesammelt (13000 U/min, Biofuge Fresco, Heraeus, Hanau, Deutschland). Das DNA-Pellet wurde in TE-Puffer gelöst. Durch dieses Verfahren hergestellte DNA konnte für alle Zwecke verwendet werden, einschließlich Southern-Blotting oder zur Konstruktion genomischer Banken.

Beispiel 2: Konstruktion genomischer *Corynebacterium glutamicum* (ATCC13032)-Banken in *Escherichia coli*

35

Ausgehend von DNA, hergestellt wie in Beispiel 1 beschrieben, wurden gemäß bekannter und gut eingeführter Verfahren (siehe bspw. Sambrook, J. et al. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Ausubel, F.M. et al. (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons) Cosmid- und Plasmid-Banken hergestellt.

40

Es ließ sich jedes Plasmid oder Cosmid einsetzen. Besondere Verwendung fanden die Plasmide pBR322 (Sutcliffe, J.G. (1979) Proc. Natl Acad. Sci. USA, 75: 3737-3741); pACYC177 (Change & Cohen (1978) J. Bacteriol. 134: 1141-1156); Plasmide der pBS-Reihe (pBSSK+, pBSSK- und andere; Stratagene, LaJolla, USA) oder Cos-

45

vide, wie SuperCos1 (Stratagene, LaJolla, USA) oder Lorist6 (Gibson, T.J. Rosenthal, A., und Waterson, R.H. (1987) Gene 53: 283-286.

5 Beispiel 3: DNA-Sequenzierung und Computer-Funktionsanalyse

Genomische Banken, wie in Beispiel 2 beschrieben, wurden zur DNA-Sequenzierung gemäß Standard-Verfahren, insbesondere dem Kettenabbruchverfahren mit ABI377-Sequenziermaschinen (s. z.B.

- 10 Fleischman, R.D. et al. (1995) "Whole-genome Random Sequencing and Assembly of Haemophilus Influenzae Rd., Science 269; 496-512) verwendet. Die Sequenzierprimer mit den folgenden Nukleotidsequenzen wurden verwendet: 5'-GGAAACAGTATGACCATG-3' oder 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'.

15

Beispiel 4: In-vivo-Mutagenese

In vivo-Mutagenese von *Corynebacterium glutamicum* kann durchgeführt werden, indem eine Plasmid- (oder andere Vektor-) DNA durch
20 *E. coli* oder andere Mikroorganismen (z.B. *Bacillus* spp. oder Hefen, wie *Saccharomyces cerevisiae*) geleitet wird, die die Integrität ihrer genetischen Information nicht aufrechterhalten können. Übliche Mutatorstämme weisen Mutationen in den Genen für das
25 DNA-Reparatursystem auf (z.B., mutHLS, mutD, mutT, usw., zum Vergleich siehe Rupp, W.D. (1996) DNA repair mechanisms in *Escherichia coli* and *Salmonella*, S. 2277-2294, ASM: Washington). Diese Stämme sind dem Fachmann bekannt. Die Verwendung dieser Stämme ist bspw. in Greener, A. und Callahan, M. (1994) Strategies 7; 32-34 veranschaulicht.

30

Beispiel 5: DNA-Transfer zwischen *Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum*

- 35 Mehrere *Corynebacterium*- und *Brevibacterium*-Arten enthalten endogene Plasmide (wie bspw. pHM1519 oder pBL1) die autonom replizieren (für einen Überblick siehe bspw. Martin, J.F. et al. (1987) Biotechnology 5: 137-146). Shuttle-Vektoren für *Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum* lassen sich leicht mittels Standard-Vektoren für *E. coli* konstruieren (Sambrook, J. et al.,
40 (1989), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Ausubel, F.M. et al. (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons), denen ein Replikationsursprung für und ein geeigneter Marker aus *Corynebacterium glutamicum* beigegeben wird. Solche Replikationsursprünge
45 werden vorzugsweise von endogenen Plasmiden entnommen, die aus *Corynebacterium*- und *Brevibacterium*-Arten isoliert worden sind.

Besondere Verwendung als Transformationsmarker für diese Arten sind Gene für Kanamycin-Resistenz (wie solche, die vom Tn5- oder Tn-903-Transposon stammen) oder für Chloramphenicol (Winnacker, E.L. (1987) "From Genes to Clones - Introduction to Gene Technology, VCH, Weinheim). Es gibt zahlreiche Beispiele in der Literatur zur Herstellung einer großen Vielzahl von Shuttle-Vektoren, die in *E. coli* und *C. glutamicum* repliziert werden, und die für verschiedene Zwecke verwendet werden können, einschließlich Gen-Überexpression (siehe bspw. Yoshihama, M. et al. (1985) J. Bacteriol. 162: 591-597, Martin, J.F. et al., (1987) Biotechnology, 5: 137-146 und Eikmanns, B.J. et al. (1992) Gene 102: 93-98).

Mittels Standard-Verfahren ist es möglich, ein Gen von Interesse in einen der vorstehend beschriebenen Shuttle-Vektoren zu klonieren und solche Hybrid-Vektoren in *Corynebacterium glutamicum*-Stämme einzubringen. Die Transformation von *C. glutamicum* läßt sich durch Protoplastentransformation (Kastsumata, R. et al., (1984) J. Bacteriol. 159, 306-311), Elektroporation (Liebl, E. et al., (1989) FEMS Microbiol. Letters, 53: 399-303) und in Fällen, bei denen spezielle Vektoren verwendet werden, auch durch Konjugation erzielen (wie z.B. beschrieben in Schäfer, A., et (1990) J. Bacteriol. 172: 1663-1666). Es ist ebenfalls möglich, die Shuttle-Vektoren für *C. glutamicum* auf *E. coli* zu übertragen, indem Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* (mittels im Fachgebiet bekannter Standard-Verfahren) präpariert wird und in *E. coli* transformiert wird. Dieser Transformationsschritt kann mit Standard-Verfahren erfolgen, jedoch wird vorteilhafterweise ein Mcr-defizienter *E. coli*-Stamm verwendet, wie NM522 (Gough & Murray (1983) J. Mol. Biol. 166: 1-19).

30

Beispiel 6: Bestimmung der Expression des mutanten Proteins

Die Beobachtungen der Aktivität eines mutierten Proteins in einer transformierten Wirtszelle beruhen auf der Tatsache, daß das mutante Protein auf ähnliche Weise und in ähnlicher Menge exprimiert wird wie das Wildtyp-Protein. Ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung der Transkriptionsmenge des mutanten Gens (ein Anzeichen für die mRNA-Menge, die für die Translation des Genprodukts verfügbar ist) ist die Durchführung eines Northern-Blots (s. bspw. Ausubel et al., (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: New York), wobei ein Primer, der so ausgestaltet ist, daß er an das Gen von Interesse bindet, mit einer nachweisbaren (gewöhnlich radioaktiven oder chemilumineszierenden) Markierung versehen wird, so daß - wenn die Gesamt-RNA einer Kultur des Organismus extrahiert, auf einem Gel aufgetrennt, auf eine stabile Matrix übertragen und mit dieser S nde inkubiert wird - die Bindung und die Quantität der Bindung der S nde das Vorliegen

und auch die Menge von mRNA für dieses Gen anzeigt. Diese Information ist ein Nachweis für das Ausmaß der Transkription des mutanten Gens. Gesamt-Zell-RNA läßt sich durch verschiedene Verfahren aus *Corynebacterium glutamicum* isolieren, die im Fachgebiet 5 bekannt sind, wie beschrieben in Bormann, E.R. et al., (1992) Mol. Microbiol. 6: 317-326.

Zur Bestimmung des Vorliegens oder der relativen Menge von Protein, das aus dieser mRNA translatiert wird, können Standard- 10 Techniken, wie Western-Blot, eingesetzt werden (s. bspw. Ausubel et al. (1988) "Current Protocols in Molecular Biology", Wiley, New York). Bei diesem Verfahren werden Gesamt-Zellproteine extrahiert, durch Gelelektrophorese getrennt, auf eine Matrix, wie Nitrocellulose, übertragen und mit einer Sonde, wie einem Anti- 15 körper, inkubiert, die an das gewünschte Protein spezifisch bindet. Diese Sonde ist gewöhnlich mit einer chemilumineszierenden oder kolorimetrischen Markierung versehen, die sich leicht nachweisen läßt. Das Vorliegen und die beobachtete Menge an Markierung zeigt das Vorliegen und die Menge des gesuchten Mutantenpro- 20 teins in der Zelle an.

Beispiel 7: Wachstum von genetisch verändertem *Corynebacterium glutamicum* - Medien und Anzuchtbedingungen

25 Genetisch veränderte Corynebakterien werden in synthetischen oder natürlichen Wachstumsmedien gezüchtet. Eine Anzahl unterschiedlicher Wachstumsmedien für Corynebakterien sind bekannt und leicht erhältlich (Lieb et al. (1989) Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 205-210; von der Osten et al. (1998) Biotechnology Letters 11: 30 11-16; Patent DE 4 120 867; Liebl (1992) "The Genus *Corynebacterium*", in: The Prokaryotes, Bd. II, Balows, A., et al., Hrsg. Springer-Verlag). Diese Medien bestehen aus einer oder mehreren Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganischen Salzen, Vitaminen und Spurenelementen. Bevorzugte Kohlenstoffquellen sind 35 Zucker, wie Mono-, Di- oder Polysaccharide. Sehr gute Kohlenstoffquellen sind bspw. Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose. Man kann Zucker auch über komplexe Verbindungen, wie Melassen, oder andere Nebenprodukte aus der 40 Zucker-Raffinierung zu den Medien geben. Es kann auch vorteilhaft sein, Gemische verschiedener Kohlenstoffquellen zuzugeben. Andere mögliche Kohlenstoffquellen sind Alkohole und organische Säuren, wie Methanol, Ethanol, Essigsäure oder Milchsäure. Stickstoffquellen sind gewöhnlich organische oder anorganische Stickstoff- 45 verbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispielhafte Stickstoffquellen umfassen Ammoniak-Gas oder Ammoniumsalze, wie NH_4Cl oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4OH , Nitrate, Harn-

stoff, Aminosäuren oder komplexe Stickstoffquellen, wie Maisquellwasser, Sojamehl, Sojaprotein, Hefeextrakte, Fleischextrakte und andere.

- 5 Anorganische Salzverbindungen, die in den Medien enthalten sein können, umfassen die Chlorid-, Phosphor-, oder Sulfatsalze von Calcium, Magnesium, Natrium, Kobalt, Molybdän, Kalium, Mangan, Zink, Kupfer und Eisen. Chelatbildner können zum Medium gegeben werden, um die Metallionen in Lösung zu halten. Besonders geeignete Chelatbildner umfassen Dihydroxyphenole, wie Catechol oder Protocatechuat oder organische Säuren, wie Citronensäure. Die Medien enthalten üblicherweise auch andere Wachstumsfaktoren, wie Vitamine oder Wachstumsförderer, zu denen bspw. Biotin, Riboflavin, Thiamin, Folsäure, Nikotinsäure, Panthothenat und Pyridoxin gehören. Wachstumsfaktoren und Salze stammen häufig von komplexen Medienkomponenten, wie Hefeextrakt, Melassen, Maisquellwasser und dergleichen. Die genaue Zusammensetzung der Medienverbindungen hängt stark vom jeweiligen Experiment ab und wird für jeden Fall individuell entschieden. Information über die Medienoptimierung ist erhältlich aus dem Lehrbuch "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Hrsg. P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) S. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Wachstumsmedien lassen sich auch von kommerziellen Anbietern beziehen, wie Standard 1 (Merck) oder BHI (Brain heart infusion, DIFCO) und dergleichen.

- Sämtliche Medienkomponenten sind sterilisiert, entweder durch Hitze (20 min bei 1,5 bar und 121°C) oder durch Sterilfiltration. Die Komponenten können entweder zusammen oder nötigenfalls getrennt sterilisiert werden. Sämtliche Medienkomponenten können zu Beginn der Anzucht zugegen sein oder wahlfrei kontinuierlich oder chargenweise hinzugegeben werden.

- Die Anzuchtbedingungen werden für jedes Experiment gesondert definiert. Die Temperatur sollte zwischen 15°C und 45°C liegen und kann während des Experimentes konstant gehalten oder verändert werden. Der pH-Wert des Mediums sollte im Bereich von 5 bis 8,5, vorzugsweise um 7,0 liegen, und kann durch Zugabe von Puffern zu den Medien aufrechterhalten werden. Ein beispielhafter Puffer für diesen Zweck ist ein Kaliumphosphatpuffer. Synthetische Puffer, wie MOPS, HEPES; ACES usw., können alternativ oder gleichzeitig verwendet werden. Der Anzucht-pH-Wert läßt sich während der Anzucht auch durch Zugabe von NaOH oder NH₄OH konstant halten. Werden komplexe Medienkomponenten, wie Hefe-Extrakt verwendet, sinkt der Bedarf an zusätzlichen Puffern, da viele komplexe Verbindungen eine hohe Pufferkapazität aufweisen. Beim Einsatz eines

Fermenters für die Anzucht von Mikroorganismen kann der pH-Wert auch mit gasförmigem Ammoniak reguliert werden.

Die Inkubationsdauer liegt gewöhnlich in einem Bereich von mehreren Stunden bis zu mehreren Tagen. Diese Zeit wird so ausgewählt, daß sich die maximale Menge Produkt in der Brühe ansammelt. Die offenbarten Wachstumsexperimente können in einer Vielzahl von Behältern, wie Mikrotiterplatten, Glasröhrchen, Glaskolben oder Glas- oder Metallfermentern unterschiedlicher Größen durchgeführt werden. Zum Screening einer großen Anzahl von Klonen sollten die Mikroorganismen in Mikrotiterplatten, Glasröhrchen oder Schüttelkolben entweder mit oder ohne Schikanen gezüchtet werden. Vorzugsweise werden 100-ml-Schüttelkolben verwendet, die mit 10% (bezogen auf das Volumen) des erforderlichen Wachstumsmediums gefüllt sind. Die Kolben sollten auf einem Kreiselerschüttler (Amplitude 25 mm) mit einer Geschwindigkeit im Bereich von 100-300 U/min geschüttelt werden. Verdampfungsverluste können durch Aufrechterhalten einer feuchten Atmosphäre verringert werden; alternativ sollte für die Verdampfungsverluste eine mathematische Korrektur durchgeführt werden.

Werden genetisch modifizierte Klone untersucht, sollten auch ein unmodifizierter Kontrollklon oder ein Kontrollklon getestet werden, der das Basisplasmid ohne Insertion enthält. Das Medium wird auf eine OD₅₀₀ von 0,5 - 1,5 angeimpft, wobei Zellen verwendet werden, die auf Agarplatten gezüchtet wurden, wie CM-Platten (10 g/l Glucose, 2,5 g/l NaCl, 2 g/l Harnstoff, 10 g/l Polypepton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l Fleischextrakt, 22 g/l Agar pH-Wert 6,8 mit 2 M NaOH), die bei 30°C inkubiert worden sind. Das Animpfen der Medien erfolgt entweder durch Einbringen einer Kochsalzlösung von *C. glutamicum*-Zellen von CM-Platten oder durch Zugabe einer flüssigen Vorkultur dieses Bakteriums.

Beispiel 8: In-vitro-Analyse der Funktion mutanter Proteine

Die Bestimmung der Aktivitäten und kinetischen Parameter von Enzymen ist im Fachgebiet gut bekannt. Experimente zur Bestimmung der Aktivität eines bestimmten veränderten Enzyms müssen an die spezifische Aktivität des Wildtypenzyms angepaßt werden, was innerhalb der Fähigkeiten des Fachmanns liegt. Überblicke über Enzyme im Allgemeinen sowie spezifische Einzelheiten, die die Struktur, Kinetiken, Prinzipien, Verfahren, Anwendungen und Beispiele zur Bestimmung vieler Enzymaktivitäten betreffen, können bspw. in den nachstehenden Literaturstellen gefunden werden: Dixon, M., und Webb, E.C: (1979) *Enzymes*, Longmans, London; Persht (1985) *Enzyme Structure and Mechanism*, Freeman, New York; Walsh (1979) *Enzymatic Reaction Mechanisms*. Freeman, San Fran-

- cisco; Price, N.C., St vens, L. (1982) Fundamentals of Enzymology. Oxford Univ. Press: Oxford; Boyer, P.D: Hrsg. (1983) The Enzymes, 3. Aufl. Academic Press, New York; Bisswanger, H. (1994) Enzymkinetik, 2. Aufl. VCH, Weinheim (ISBN 3527300325); Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, J., Graßl, M. Hrsg. (1983-1986) Methods of Enzymatic Analysis, 3. Aufl. Bd. I-XII, Verlag Chemie: Weinheim; und Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1987) Bd. A9, "Enzymes", VCH, Weinheim, S. 352-363.
- 10 Die Aktivität von Proteinen, die an DNA binden, kann durch viele gut eingeführte Verfahren gemessen werden, wie DNA-Banden-Shift-Assays (die auch als Gelretardations-Assays bezeichnet werden). Die Wirkung dieser Proteine auf die Expression anderer Moleküle kann mit Reporter-genassays (wie beschrieben in Kolmar, H. et al., 15 (1995) EMBO J. 14: 3895-3904 und den darin zitierten Literaturstellen) gemessen werden. Reporter-gen-Testsysteme sind wohl-bekannt und für Anwendungen in pro- und eukaryotischen Zellen etabliert, wobei Enzyme, wie beta-Galactosidase, Grün-Fluoreszenz-Protein und mehrere andere verwendet werden.
- 20 Die Bestimmung der Aktivität von Membran-Transportproteinen kann gemäß den Techniken, wie beschrieben in Gennis, R.B. (1989) "Pores, Channels and Transporters", in Biomembranes, Molecular Structure and Function, Springer: Heidelberg, S. 85-137; 199-234; 25 und 270-322, erfolgen.
- Beispiel 9: Analyse des Einflusses von mutiertem Protein auf die Produktion des gewünschten Produktes
- 30 Die Wirkung der genetischen Modifikation in *C. glutamicum* auf die Produktion einer gewünschten Verbindung (wie einer Aminosäure) kann bestimmt werden, indem die modifizierten Mikroorganismen unter geeigneten Bedingungen (wie solchen, die vorstehend beschrieben sind) gezüchtet werden und das Medium und/oder die zellulären Komponenten auf die erhöhte Produktion des gewünschten Produktes (d.h. einer Aminosäure) untersucht wird. Solche Analysetechniken sind dem Fachmann wohlbekannt und umfassen Spektroskopie, Dünnschichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymatische und mikrobiologische Verfahren sowie analytische Chromatographie, wie Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (s. bspw. Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 89-90 und S. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A., et al., (1987) "Applications f HPLC in Biochemistry" in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17; 40 Rehm et al. (1993) Biotechnology, Bd. 3, Kapitel III: "Product recovery and purification", S. 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A. et al. (1988) Bioseparations: downstream processing for Bio-

- technology, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F. und Cabral, J.M.S. (1992) Recovery processes for biological Materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A. und Henry, J.D. (1988) Biochemical Separations, in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5 Bd. B3; Kapitel 11, S. 1-27, VCH: Weinheim; und Dechow, F.J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).

Zusätzlich zur Messung des Fermentationsendproduktes ist es eben-
10 falls möglich, andere Komponenten der Stoffwechselwege zu analy-
sieren, die zur Produktion der gewünschten Verbindung verwendet
werden, wie Zwischen- und Nebenprodukte, um die Gesamt-Produkti-
vität des Organismus, die Ausbeute und/oder die Effizienz der
Produktion der Verbindung zu bestimmen. Die Analyseverfahren um-
15 fassen Messungen der Nährstoffmengen im Medium (bspw. Zucker,
Kohlenwasserstoffe, Stickstoffquellen, Phosphat und andere
Ionen), Messungen der Biomassezusammensetzung und des Wachstums,
Analyse der Produktion gewöhnlicher Metabolite aus Biosynthese-
wegen und Messungen von Gasen, die während der Fermentation er-
20 zeugt werden. Standardverfahren für diese Messungen sind in
Applied Microbial Physiology; A Practical Approach; P.M. Rhodes
und P.F. Stanbury, Hrsg. IRL Press, S. 103-129; 131-163 und
165-192 (ISEN: 0199635773) und den darin angegebenen Literatur-
stellen beschrieben.

25

Beispiel 10: Reinigung des gewünschten Produktes aus *C. glutami-*
cum-Kultur

- Die Gewinnung des gewünschten Produktes aus *C. glutamicum*-Zellen
30 oder aus dem Überstand der vorstehend beschriebenen Kultur kann
durch verschiedene, im Fachgebiet bekannte Verfahren erfolgen.
Wird das gewünschte Produkt von den Zellen nicht sezerniert, kön-
nen die Zellen aus der Kultur durch langsame Zentrifugation ge-
erntet werden, die Zellen können durch Standard-Techniken, wie
35 mechanische Kraft oder Ultraschall, lysiert werden. Die
Zelltrümmer werden durch Zentrifugation entfernt, und die Über-
standsfraktion, die die löslichen Proteine enthält, wird zur wei-
teren Reinigung der gewünschten Verbindung erhalten. Wird das
Produkt von den *C. glutamicum*-Zellen sezerniert, werden die Zel-
40 len durch langsame Zentrifugation aus der Kultur entfernt, und
die Überstandsfraktion wird zur weiteren Reinigung behalten.

- Die Überstandsfraktion aus beiden Reinigungsverfahren wird einer
Chromatographie mit einem geeigneten Harz unterworfen, wobei das
45 gewünschte Molekül entweder auf dem Chromatographieharz zurückge-
halten wird, viele Verunreinigungen in der Probe jedoch nicht,
oder wobei die Verunreinigungen auf dem Harz zurückbleiben, die

37

Probe hingegen nicht. Diese Chromatographieschritte können nötigenfalls wiederholt werden, wobei die gleichen oder andere Chromatographieharze verwendet werden. Der Fachmann ist in der Auswahl der geeigneten Chromatographieharze und der wirksamsten Anwendung für ein bestimmtes, zu reinigendes Molekül bewandert. Das gereinigte Produkt kann durch Filtration oder Ultrafiltration konzentriert und bei einer Temperatur aufbewahrt werden, bei der die Stabilität des Produktes maximal ist.

- 10 Im Fachgebiet sind viele Reinigungsverfahren bekannt, die nicht auf das vorhergehende Reinigungsverfahren eingeschränkt sind. Diese sind bspw. beschrieben in Bailey, J.E. & Ollis, D.F. Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill: New York (1986).
- 15 Die Identität und Reinheit der isolierten Verbindungen kann durch Standard-Techniken des Fachgebiets bestimmt werden. Diese umfassen Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), spektroskopische Verfahren, Färbeverfahren, Dünnschichtchromatographie,
- 20 NIRS, Enzymtest oder mikrobiologische Tests. Diese Analyseverfahren sind zusammengefaßt in: Patek et al. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60: 133-140; Malakhova et al. (1996) Biotekhnologiya 11: 27-32; und Schmidt et al. (1998) Bioprocess Engineer. 19: 67-70. Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996) Bd.
- 25 A27, VCH: Weinheim, S. 89-90, S. 521-540, S. 540-547, S. 559-566, 575-581 und S. 581-587; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A. et al. (1987) Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology,
- 30 Bd. 17.

Äquivalente

- Der Fachmann erkennt oder kann - indem er lediglich Routineverfahren verwendet - viele Äquivalente der erfindungsgemäßen spezifischen Ausführungsformen feststellen. Diese Äquivalente sollen von den nachstehenden Patentansprüchen umfaßt sein.
- 35

Die Angaben in Tabelle 1 sind folgendermassen zu verstehen:

- 40 In Spalte 1 "DNA-ID" bezieht sich die jeweilige Zahl auf die SEQ ID NO des anhängenden Sequenzprotokolls. Eine "5" in der Spalte "DNA-ID" bedeutet demzufolge ein Verweis auf SEQ ID NO:5.

38

In Spalte 2 "AS-ID" bezieht sich die jeweilige Zahl auf die SEQ ID NO des anhängenden Sequenzprotokolls. Eine "6" in der Spalte "AS-ID" bedeutet demzufolge ein Verweis auf SEQ ID NO:6.

5 In Spalte 3 "Identifikation" wird eine eindeutige interne Bezeichnung für jede Sequenz aufgeführt.

In Spalte 4 "AS-POS" bezieht sich die jeweilige Zahl auf die Aminosäureposition der Polypeptidsequenz "AS-ID" in der gleichen
10 Zeile. Eine "26" in der Spalte "AS-POS" bedeutet demzufolge die Aminosäureposition 26 der entsprechend angegebenen Polypeptidsequenz. Die Zählung der Position beginnt N-Terminal bei +1.

In Spalte 5 "AS-Wildtyp" bezeichnet der jeweilige Buchstabe die
15 Aminosäure - dargestellt im Ein-Buchstaben-Code- an der in Spalte 4 angegebenen Position beim entsprechenden Wildtyp-Stamm.

In Spalte 6 "AS-Mutante" bezeichnet der jeweilige Buchstabe die Aminosäure - dargestellt im Ein-Buchstaben-Code- an der in Spalte
20 4 angegebenen Position beim entsprechenden Mutanten-Stamm.

In Spalte 7 "Funktion" wird die physiologische Funktion der entsprechenden Polypeptidsequenz aufgeführt.

25 Ein-Buchstaben-Code der proteinogenen Aminosäuren:

	A	Alanin
	C	Cystein
	D	Aspartat
30	E	Glutamat
	F	Phenylalanin
	G	Glycin
	H	His
	I	Isoleucin
35	K	Lysin
	L	Leucin
	M	Methionin
	N	Asparagin
	P	Prolin
40	Q	Glutamin
	R	Arginin
	S	Serin
	T	Threonin
	V	Valin
45	W	Tryptophan
	Y	Tyrosin

Tabelle 1

Gene die für Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase Proteine codieren

DNA AS		Identifikation:		AS	AS	Funktion:
ID: ID:		Pos:		Wildtypmutante		
1	2	RXA02737	243	A	T	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Patentansprüche

- 5 1. Isoliertes Nukleinsäuremolekül codierend für ein Polypeptid mit der jeweils in Tabelle1/Spalte2 in Bezug genommenen Aminosäuresequenz wobei das Nukleinsäuremolekül in der in Tabelle1/Spalte4 angegebenen Aminosäureposition eine andere proteinogene Aminosäure codiert als die jeweilige in Tabelle1/Spalte5 in der gleichen Zeile angegebene Aminosäure.
- 10 2. Isoliertes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei das Nukleinsäuremolekül in der in Tabelle1/Spalte4 angegebenen Aminosäureposition die in Tabelle1/Spalte6 in der gleichen Zeile angegebene Aminosäure codiert.
- 15 3. Ein Vektor, der wenigstens eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 enthält.
- 20 4. Eine Wirtszelle, die mit wenigstens einem Vektor nach Anspruch 3 transfiziert ist.
5. Eine Wirtszelle nach Anspruch 4, wobei die Expression des besagten Nukleinsäuremoleküls zur Modulation der Produktion einer Feinchemikalie aus besagter Zelle führt.
- 25 6. Verfahren zur Herstellung einer Feinchemikalie welches die Kultivierung einer Zelle beinhaltet, die mit wenigstens einen Vektor nach Anspruch 3 transfiziert worden ist, so dass die Feinchemikalie produziert wird.
- 30 7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Feinchemikalie eine Aminosäure ist.
- 35 8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäure Lysin ist.

SEQUENCE LISTING

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase

<130> OZ0050/53030

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1672

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> 5'UTR

<222> (1)..(100)

<220>

<221> CDS

<222> (101)..(1645)

<220>

<221> 3'UTR

<222> (1646)..(1672)

<400> 1

agcagcgtgc atcagtaacg gcgacatgaa atcgaattag ttcgatctta tgtggccgtt 60

acacatcttt	cattaaagaa	aggatcgtga	cactaccatc	gtg	agc	aca	aac	acg	115
				Val	Ser	Thr	Asn	Thr	
				1				5	

acc	ccc	tcc	agc	tgg	aca	aac	cca	ctg	cgc	gac	ccg	cag	gat	aaa	cga	163
Thr	Pro	Ser	Ser	Trp	Thr	Asn	Pro	Leu	Arg	Asp	Pro	Gln	Asp	Lys	Arg	
			10					15					20			

ctc	ccc	cgc	atc	gct	ggc	cct	tcc	ggc	atg	gtg	atc	ttc	ggg	gtc	act	211
Leu	Pro	Arg	Ile	Ala	Gly	Pro	Ser	Gly	Met	Val	Ile	Phe	Gly	Val	Thr	
			25					30					35			

ggc	gac	ttg	gct	cga	aag	aag	ctg	ctc	ccc	gcc	att	tat	gat	cta	gca	259
Gly	Asp	Leu	Ala	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Pro	Ala	Ile	Tyr	Asp	Leu	Ala	
		40					45					50				

aac	cgc	gga	ttg	ctg	ccc	cca	gga	ttc	tcg	ttg	gta	ggg	tac	ggc	cgc	307
Asn	Arg	Gly	Leu	Leu	Pro	Pro	Gly	Ph	Ser	Leu	Val	Gly	Tyr	Gly	Arg	
		55				60					65					

cgc	gaa	tgg	tcc	aaa	gaa	gac	ttt	gaa	aaa	tac	gta	cgc	gat	gcc	gca	355
Arg	Glu	Trp	Ser	Lys	Glu	Asp	Phe	Glu	Lys	Tyr	Val	Arg	Asp	Ala	Ala	

70	75	80	85	
agt gct ggt gct cgt acg gaa ttc cgt gaa aat gtt tgg gag cgc ctc				403
Ser Ala Gly Ala Arg Thr Glu Phe Arg Glu Asn Val Trp Glu Arg Leu	90	95	100	
gcc gag ggt atg gaa ttt gtt cgc ggc aac ttt gat gat gat gca gct				451
Ala Glu Gly Met Glu Phe Val Arg Gly Asn Phe Asp Asp Asp Ala Ala	105	110	115	
ttc gac aac ctc gct gca aca ctc aag cgc atc gac aaa acc cgc ggc				499
Phe Asp Asn Leu Ala Ala Thr Leu Lys Arg Ile Asp Lys Thr Arg Gly	120	125	130	
acc gcc ggc aac tgg gct tac tac ctg tcc att cca cca gat tcc ttc				547
Thr Ala Gly Asn Trp Ala Tyr Leu Ser Ile Pro Pro Asp Ser Phe	135	140	145	
aca gcg gtc tgc cac cag ctg gag cgt tcc ggc atg gct gaa tcc acc				595
Thr Ala Val Cys His Gln Leu Glu Arg Ser Gly Met Ala Glu Ser Thr	150	155	160	165
gaa gaa gca tgg cgc cgc gtg atc atc gag aag cct ttc ggc cac aac				643
Glu Glu Ala Trp Arg Arg Val Ile Ile Glu Lys Pro Phe Gly His Asn	170	175	180	
ctc gaa tcc gca cac gag ctc aac cag ctg gtc aac gca gtc ttc cca				691
Leu Glu Ser Ala His Glu Leu Asn Gln Leu Val Asn Ala Val Phe Pro	185	190	195	
gaa tct tct gtg ttc cgc atc gac cac tat ttg ggc aag gaa aca gtt				739
Glu Ser Ser Val Phe Arg Ile Asp His Tyr Leu Gly Lys Glu Thr Val	200	205	210	
caa aac atc ctg gct ctg cgt ttt gct aac cag ctg ttt gag cca ctg				787
Gln Asn Ile Leu Ala Leu Arg Phe Ala Asn Gln Leu Phe Glu Pro Leu	215	220	225	
tgg aac tcc aac tac gtt gac cac gtc cag atc acc atg gct gaa gat				835
Trp Asn Ser Asn Tyr Val Asp His Val Gln Ile Thr Met Ala Glu Asp	230	235	240	245
att ggc ttg ggt gga cgt gct ggt tac tac gac ggc atc ggc gca gcc				883
Ile Gly Leu Gly Gly Arg Ala Gly Tyr Tyr Asp Gly Ile Gly Ala Ala	250	255	260	
cgc gac gtc atc cag aac cac ctg atc cag ctc ttg gct ctg gtt gcc				931
Arg Asp Val Ile Gln Asn His Leu Ile Gln Leu Leu Ala Leu Val Ala	265	270	275	
atg gaa gaa cca att tct ttc gtg cca gcg cag ctg cag gca gaa aag				979
Met Glu Glu Pro Ile Ser Phe Val Pro Ala Gln Leu Gln Ala Glu Lys	280	285	290	
atc aag gtg ctc tct gcg aca aag ccg tgc tac cca ttg gat aaa acc				1027
Ile Lys Val Leu Ser Ala Thr Lys Pro Cys Tyr Pro Leu Asp Lys Thr	295	300	305	

tcc gct cgt ggt cag tac gct gcc ggt tgg cag ggc tct gag tta gtc	1075
Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly Trp Gln Gly Ser Glu Leu Val	
310 315 320 325	
aag gga ctt cgc gaa gaa gat ggc ttc aac cct gag tcc acc act gag	1123
Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe Asn Pro Glu Ser Thr Thr Glu	
330 335 340	
act ttt gcg gct tgt acc tta gag atc acg tct cgt cgc tgg gct ggt	1171
Thr Phe Ala Ala Cys Thr Leu Glu Ile Thr Ser Arg Arg Trp Ala Gly	
345 350 355	
gtg ccg ttc tac ctg cgc acc ggt aag cgt ctt ggt cgc cgt gtt act	1219
Val Pro Phe Tyr Leu Arg Thr Lys Arg Leu Gly Arg Arg Val Thr	
360 365 370	
gag att gcc gtg gtg ttt aaa gac gca cca cac cag cct ttc gac ggc	1267
Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala Pro His Gln Pro Phe Asp Gly	
375 380 385	
gac atg act gta tcc ctt ggc caa aac gcc atc gtg att cgc gtg cag	1315
Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn Ala Ile Val Ile Arg Val Gln	
390 395 400 405	
cct gat gaa ggt gtg ctc atc cgc ttc ggt tcc aag gtt cca ggt tct	1363
Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe Gly Ser Lys Val Pro Gly Ser	
410 415 420	
gcc atg gaa gtc cgt gac gtc aac atg gac ttc tcc tac tca gaa tcc	1411
Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met Asp Phe Ser Tyr Ser Glu Ser	
425 430 435	
ttc act gaa gaa tca cct gaa gca tac gag cgc ctc att ttg gat gcg	1459
Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr Glu Arg Leu Ile Leu Asp Ala	
440 445 450	
ctg tta gat gaa tcc agc ctc ttc cct acc aac gag gaa gtg gaa ctg	1507
Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro Thr Asn Glu Glu Val Glu Leu	
455 460 465	
agc tgg aag att ctg gat cca att ctt gaa gca tgg gat gcc gat gga	1555
Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu Glu Ala Trp Asp Ala Asp Gly	
470 475 480 485	
gaa cca gag gat tac cca gcg ggt acg tgg ggt cca aag agc gct gat	1603
Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr Trp Gly Pro Lys Ser Ala Asp	
490 495 500	
gaa atg ctt tcc cgc aac ggt cac acc tgg cgc agg cca taa	1645
Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr Trp Arg Arg Pro	
505 510 515	
tttaggggca aaaaatgatc tttagaac	1672

<211> 514

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 2

Val Ser Thr Asn Thr Thr Pro Ser Ser Trp Thr Asn Pro Leu Arg Asp
 1 5 10 15

Pro Gln Asp Lys Arg Leu Pro Arg Ile Ala Gly Pro Ser Gly Met Val
 20 25 30

Ile Phe Gly Val Thr Gly Asp Leu Ala Arg Lys Lys Leu Leu Pro Ala
 35 40 45

Ile Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Gly Leu Leu Pro Pro Gly Phe Ser Leu
 50 55 60

Val Gly Tyr Gly Arg Arg Glu Trp Ser Lys Glu Asp Phe Glu Lys Tyr
 65 70 75 80

Val Arg Asp Ala Ala Ser Ala Gly Ala Arg Thr Glu Phe Arg Glu Asn
 85 90 95

Val Trp Glu Arg Leu Ala Glu Gly Met Glu Phe Val Arg Gly Asn Phe
 100 105 110

Asp Asp Asp Ala Ala Phe Asp Asn Leu Ala Ala Thr Leu Lys Arg Ile
 115 120 125

Asp Lys Thr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Trp Ala Tyr Tyr Leu Ser Ile
 130 135 140

Pro Pro Asp Ser Phe Thr Ala Val Cys His Gln Leu Glu Arg Ser Gly
 145 150 155 160

Met Ala Glu Ser Thr Glu Glu Ala Trp Arg Arg Val Ile Ile Glu Lys
 165 170 175

Pro Phe Gly His Asn Leu Glu Ser Ala His Glu Leu Asn Gln Leu Val
 180 185 190

Asn Ala Val Phe Pro Glu Ser Ser Val Phe Arg Ile Asp His Tyr Leu
 195 200 205

Gly Lys Glu Thr Val Gln Asn Ile Leu Ala Leu Arg Phe Ala Asn Gln
 210 215 220

Leu Phe Glu Pro Leu Trp Asn Ser Asn Tyr Val Asp His Val Gln Ile
 225 230 235 240

Thr Met Ala Glu Asp Ile Gly Leu Gly Gly Arg Ala Gly Tyr Tyr Asp
 245 250 255

Gly Ile Gly Ala Ala Arg Asp Val Ile Gln Asn His Leu Ile Gln Leu
 260 265 270

Leu Ala Leu Val Ala Met Glu Glu Pro Ile Ser Phe Val Pro Ala Gln

275	280	285
Leu Gln Ala Glu Lys Ile Lys Val Leu Ser Ala Thr Lys Pro Cys Tyr 290 295 300		
Pro Leu Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly Trp Gln 305 310 315 320		
Gly Ser Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe Asn Pro 325 330 335		
Glu Ser Thr Thr Glu Thr Phe Ala Ala Cys Thr Leu Glu Ile Thr Ser 340 345 350		
Arg Arg Trp Ala Gly Val Pro Phe Tyr Leu Arg Thr Gly Lys Arg Leu 355 360 365		
Gly Arg Arg Val Thr Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala Pro His 370 375 380		
Gln Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn Ala Ile 385 390 395 400		
Val Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe Gly Ser 405 410 415		
Lys Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met Asp Phe 420 425 430		
Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr Glu Arg 435 440 445		
Leu Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro Thr Asn 450 455 460		
Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu Glu Ala 465 470 475 480		
Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr Trp Gly 485 490 495		
Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr Trp Arg 500 505 510		
Arg Pro		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/12556

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7 C12N15/53 C12N9/04 C12N1/21 C12P13/08		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EMBL, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 004322 A (DEGUSSA ;KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH (DE); NAT UNIVERSITY OF IREL) 18 January 2001 (2001-01-18) the whole document ---	1-8
X	WO 01 70995 A (DEGUSSA ;KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH (DE); NAT UNIVERSITY OF IREL) 27 September 2001 (2001-09-27) the whole document --- -/-	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 February 2003		Date of mailing of the international search report 27/03/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Kania, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/12556

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! Database accession no. AX065117 XP002230686 abstract	1-8
X	-& DATABASE SWALL 'Online! Database accession no. CAC25798 XP002232070 abstract	1-8
X	-& WO 01 00844 A (BASF AG) 4 January 2001 (2001-01-04)	1-8
Y	Seq id no: 243 page 57, line 17 -page 58, line 27; table 1	1-8
P, Y	WO 01 98472 A (HASHIMOTO SHIN ICHI ;ANDO SEIKO (JP); OCHIAI KEIKO (JP); YOKOI HAR) 27 December 2001 (2001-12-27) SEQ ID NO:9	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/12556

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 01004322	A	18-01-2001	AU 5982100 A	30-01-2001
			AU 6822000 A	30-01-2001
			BR 0006909 A	12-06-2001
			BR 0006915 A	31-07-2001
			CN 1317049 T	10-10-2001
			CN 1317050 T	10-10-2001
			WO 0104322 A1	18-01-2001
			WO 0104325 A1	18-01-2001
			EP 1109913 A1	27-06-2001
			EP 1109915 A1	27-06-2001
			HU 0104068 A2	28-03-2002
			HU 0104450 A2	29-04-2002
			PL 346500 A1	11-02-2002
			PL 346563 A1	11-02-2002
			SK 3012001 A3	02-07-2002
			SK 3022001 A3	04-04-2002
WO 0170995	A	27-09-2001	AU 6821900 A	03-10-2001
			BR 0011283 A	05-03-2002
			CN 1353758 T	12-06-2002
			WO 0170995 A1	27-09-2001
			EP 1179073 A1	13-02-2002
			SK 16532001 A3	02-07-2002
WO 0198472	A	27-12-2001	AU 7453701 A	02-01-2002
			WO 0198472 A1	27-12-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/12556

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/53 C12N9/04 C12N1/21 C12P13/08

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EMBL, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 01 004322 A (DEGUSSA ;KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH (DE); NAT UNIVERSITY OF IREL) 18. Januar 2001 (2001-01-18) das ganze Dokument	1-8
X	WO 01 70995 A (DEGUSSA ;KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH (DE); NAT UNIVERSITY OF IREL) 27. September 2001 (2001-09-27) das ganze Dokument	1-8

	--- --	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Erfindung zugrundeliegenden Prinzipien oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. Februar 2003

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

27/03/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patenlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Kanla, T

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/12556

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EMBL 'Online! Database accession no. AX065117 XP002230686 Zusammenfassung	1-8
X	-& DATABASE SWALL 'Online! Database accession no. CAC25798 XP002232070 Zusammenfassung	1-8
X	-& WO 01 00844 A (BASF AG) 4. Januar 2001 (2001-01-04)	1-8
Y	Seq id no: 243 Seite 57, Zeile 17 -Seite 58, Zeile 27; Tabelle 1	1-8
P,Y	WO 01 98472 A (HASHIMOTO SHIN ICHI ;ANDO SEIKO (JP); OCHIAI KEIKO (JP); YOKOI HAR) 27. Dezember 2001 (2001-12-27) SEQ ID NO:9	1-8

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/12556

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 01004322 A	18-01-2001	AU 5982100 A	30-01-2001
		AU 6822000 A	30-01-2001
		BR 0006909 A	12-06-2001
		BR 0006915 A	31-07-2001
		CN 1317049 T	10-10-2001
		CN 1317050 T	10-10-2001
		WO 0104322 A1	18-01-2001
		WO 0104325 A1	18-01-2001
		EP 1109913 A1	27-06-2001
		EP 1109915 A1	27-06-2001
		HU 0104068 A2	28-03-2002
		HU 0104450 A2	29-04-2002
		PL 346500 A1	11-02-2002
		PL 346563 A1	11-02-2002
		SK 3012001 A3	02-07-2002
		SK 3022001 A3	04-04-2002
WO 0170995 A	27-09-2001	AU 6821900 A	03-10-2001
		BR 0011283 A	05-03-2002
		CN 1353758 T	12-06-2002
		WO 0170995 A1	27-09-2001
		EP 1179073 A1	13-02-2002
		SK 16532001 A3	02-07-2002
WO 0198472 A	27-12-2001	AU 7453701 A	02-01-2002
		WO 0198472 A1	27-12-2001